

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Kristýna Holíková

Genetické pozadí a šíření azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus*
Genetic background and spread of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*

Bakalářská práce

Školitel: MUDr. Mgr. Vít Hubka, Ph.D.

Praha 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani žádná její podstatná část nebyla použita k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 9. 5. 2019.

Podpis:

Kristýna Holíková

Poděkování

Děkuji mému školiteli MUDr. Mgr. Vítovi Hubkovi, Ph.D. za odborné konzultace a trpělivost. Zároveň bych chtěla poděkovat mé rodině a blízkým za podporu při psaní této bakalářské práce.

Abstrakt

Aspergillus je celosvětově rozšířený rod saprofytických vláknitých hub, zahrnující oportunistické patogenní druhy, které způsobují onemocnění zvané aspergilóza. V léčbě aspergilózy mají nezastupitelnou roli azolové deriváty, které inhibují biosyntetickou dráhu ergosterolu, což vede k narušení plazmatické membrány hub. Prevalence rezistence vůči azolům u aspergilů v současné době rapidně narůstá, což zvyšuje mortalitu pacientů. Cílem této bakalářské práce je shrnutí dosavadních poznatků spojených s rezistencí vůči azolům se zaměřením na její genetické pozadí a globální rozšíření. Hlavní důraz je kladen na situaci u druhu *Aspergillus fumigatus*, který je nejčastějším původcem aspergilózy. Rezistence k azolovým derivátům vzniká při dlouhodobém vystavení hub azolovým léčivům či fungicidům. V největší míře dochází k jejímu vzniku při užívání azolových fungicidů v zemědělství. Mechanismů rezistence je celá řada. Většina z nich se týká mutací v genu *cyp51A*, na který působí azoly, a v jeho promotoru. Celosvětově nejrozšířenější je mutace TR₃₄/L98H zahrnující tandemové repetice v promotoru genu kombinované s bodovými mutacemi. Nejčastější mechanismus rezistence, který není spojený se změnami v genu *cyp51A*, je zvýšená exprese efluxních pump. Mutace způsobují odolnost vůči azolům a nenarušují výrazně produkci ergosterolu. Práce dále shrnuje známé rozšíření rezistence v klinickém i environmentálním prostředí ve světě a molekulární mechanismy, kterými je rezistence podmíněna. V závěru práce jsou shrnuty možnosti prevence vzniku a šíření rezistence.

Klíčová slova: azolové deriváty, antifungální rezistence, *Aspergillus fumigatus*, aspergilóza, *cyp51*

Abstract

Aspergillus is a globally widespread saprophytic filamentous genus of fungi, including opportunistic pathogenic species that cause a disease called aspergillosis. Azole derivatives have an irreplaceable role in the treatment of aspergillosis. These drugs inhibit the biosynthetic pathway of ergosterol. That leads to disruption of the fungal plasma membrane. However, nowadays, the rate of occurrence of azole-resistant fungi is rapidly increasing, which also increases the mortality of the patients. The aim of this bachelor thesis is to summarize the current knowledge associated with azole resistance with focus on its genetic background and global distribution. The main emphasis is given on the species *Aspergillus fumigatus* which is the most common agent of aspergillosis. Resistance to azole derivatives arises from prolonged fungi exposure to azole drugs or fungicides. The most common origin of azole resistance relates to the use of azole fungicides in agriculture. There are several ways how the resistance works. Most of them, however, relate to changes in the *cyp51A* gene, which is affected by azoles, and its promoter, with the most frequent mutation being TR₃₄/L98H. The most common mechanism of the resistance that is not associated with changes in the *cyp51A* gene is increased expression of efflux pumps. The mutations cause the resistance to azole derivatives with no significant disturb in production of the ergosterol. The main part of this work is about resistance with focus on its spread in the environmental and clinical environment, and its molecular mechanisms. In the end of this thesis I summarized the possibilities of prevention of azole resistance origin and spread.

Key words: azole derivatives, antifungal resistance, *Aspergillus fumigatus*, aspergillosis, *cyp51*

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Aspergilóza.....	2
2.1	Aspergily	2
2.2	Léčba	3
3	Azolové deriváty	4
3.1	Mechanismus účinku	5
4	Fungální rezistence k azolovým derivátům.....	5
4.1	Vznik a šíření rezistence.....	6
4.1.1	Vznik rezistence	7
4.1.2	Šíření rezistence	8
4.2	Molekulární mechanismy rezistence	10
4.2.1	Mutace v cílových genech a jejich rozšíření	13
4.3	Detekce rezistentních kmenů v praxi.....	17
5	Závěr.....	18
6	Seznam zdrojů	20

1 Úvod

V posledním desetiletí byl zaznamenán výrazný nárůst počtů rezistentních kmenů u rodu *Aspergillus* (Hassan *et al.*, 2014). Zástupci tohoto celosvětově rozšířeného rodu se vyskytují jako saprofyty v půdě, na rostlinných a živočišných zbytcích, v ovzduší a klinickém materiálu. Způsobují aspergilózu, což je nejčastější život ohrožující infekce vyvolaná oportunními vláknitými houbami zejména u imunosuprimovaných pacientů (Judson & Walsh, 2000). Mortalita pacientů s invazivní aspergilózou infikovaných kmeny dobře citlivými k běžným antimykotikům se pohybuje mezi 30–50 % (Hassan *et al.*, 2014). Avšak v případě kmenů rezistentních se mortalita pohybuje až okolo 88 % (Linden *et al.*, 2011). Aspergilóza se ve většině případů léčí pomocí triazolových léčiv, amfotericinu B a echinokandinů (Walsh *et al.*, 2008). Díky nadměrnému používání fungicidů, obsahujících azolové deriváty, se rapidně zvýšil podíl rezistentních kmenů aspergilů (Hassan *et al.*, 2014). U pacientů s invazivní aspergilózou může rezistence klinických izolátů dosahovat až 29 % (Steinmann *et al.*, 2014). Včasná diagnóza je zásadní pro prognózu pacientů. Přesné a rychlé určení původce a jeho citlivosti k antimykotikům hraje významnou roli pro upřesnění léčby (Lestrade *et al.*, 2018). Včasná identifikace patogena je ale často problematická kvůli problémům s izolací kmenu a velkému počtu kryptických druhů aspergilů, které mohou také vyvolávat toto onemocnění. Proto je cílená léčba často započata až v pokročilém stádiu (Armstrong, 1989, Nedel & Pasqualotto, 2014).

I přes to, že studie v posledních letech odhalily většinu mechanismů rezistence, základní biologické ukazatele rezistence ještě plně objasněné nejsou (Perlin *et al.*, 2017). Kromě triazolů, amfotericinu B a echinokandinů není žádné jiné léčivo, které by mělo fungicidní či fungistatický vliv na patogenní aspergily (Walsh *et al.*, 2008). Přestože počet rezistentních kmenů stále rapidně narůstá, výrazné omezení nadužívání azolových fungicidů v zemědělství a skladování surovin je nesnadné v praxi aplikovat z ekonomických důvodů (Tullion *et al.*, 2012, Linden *et al.*, 2015). Proto je zapotřebí tématu rezistence věnovat pozornost, a odhalit detailní molekulární mechanismy rezistence a způsob jejich vzniku. Alternativním přístupem je hledání jiných vhodných léčiv, která by nahradila některá v současnosti užívaná antimykotika.

2 Aspergilóza

Aspergilóza je infekční onemocnění způsobené houbami rodu *Aspergillus*. Klinicky se projevuje různými způsoby, např. jako invazivní aspergilóza, aspergilom, alergická bronchopulmonární aspergilóza, aj. Kvůli vysoké mortalitě imunosuprimovaných pacientů s invazivní aspergilózou je třeba zahájit agresivní léčbu co nejdříve (Judson & Walsh, 2000). Včasná diagnóza je tedy pro léčbu esenciální a taktéž je důležité stanovit, zdali je kmen, který ji způsobuje rezistentní vůči některému z léčiv.

V roce 2012 byla incidence invazivní aspergilózy odhadnuta na více než 200 000, s mortalitou mezi 35 a 95 % (Brown *et al.*, 2012). Například více než 1,2 milionů lidí celosvětově trpí chronickou pulmonální aspergilózou (Denning *et al.*, 2016).

Aspergillus působí jako patogen převážně u imunosuprimovaných pacientů, jelikož u zdravých pacientů imunita zabrání infekci (Latgé, 1999). Ohroženi jsou tedy pacienti po transplantaci, pacienti s nádorovým onemocněním procházející chemoterapií, pacienti léčení se kortikosteroidy, nebo trpící HIV infekcí v pokročilejším stádiu a jinými chorobami, které razantně oslabují činnost imunitního systému. (Kosmidis & Denning, 2015).

2.1 Aspergily

Rodové jméno *Aspergillus* poprvé použil v roce 1729 Micheli. Rod zahrnuje více než 400 druhů rozdělených přibližně do 25 sekcí, z nichž je okolo 40 druhů patogenních pro člověka. Fylogeneticky příbuzné druhy jsou si morfologicky často velmi podobné a jejich rozlišení je možné především na základě molekulárně genetických dat (kryptické druhy) (Bennett, 2010, Hubka *et al.*, 2018).

Aspergillus je saprofytická všudypřítomná vláknitá houba s kosmopolitním rozšířením (Judson & Walsh, 2000). Konidie se roznáší vzduchem a díky své malé velikosti jsou snadno vdechnutelné. Tímto způsobem se dostávají do plicních sklípků, kde u imunosuprimovaných pacientů mohou klíčit, růst a napadat plicní tkáň. Při teplotě těla člověka mycelium většiny druhů roste velice rychle, k čemuž přispívá i to, že aspergily většinou nejsou náročné na živiny (Latgé, 2001). Kromě *A. fumigatus* aspergilózu často způsobují i druhy: *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* a *A. nidulans* (Judson & Walsh, 2000, Sugui *et al.*, 2015).

Vzácněji aspergilózu způsobují druhy tzv. kryptické jmenovaných zástupců, které jsou jim fylogeneticky příbuzné a morfologicky podobné. Mezi nejvýznamnější kryptické druhy *A. fumigatus* se řadí například: *Aspergillus lentulus*, nebo zástupci komplexu *Aspergillus viridinutans* jako *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus felis*, nebo *Aspergillus pseudoviridinutans*

atd. Oproti *A. fumigatus* jsou kryptické druhy často méně termotolerantní a virulentní, a způsobují spíše infekce chronického charakteru (Lamoth, 2016).

Frekvence výskytu kryptických druhů v klinickém materiálu se pohybuje podle různých studií od 11 % do 19 % (Hubka *et al.*, 2018). Správná identifikace druhu (například v komplexu *A. fumigatus*), která je u kryptických druhů obtížná a na řadě klinických pracovišť se ani neprovádí. Správná identifikace je ale často určující pro správné zvolení antifungální léčby, protože profily antifungálních citlivostí jsou často druhově specifické. V jiných skupinách, například v komplexu *A. niger*, není profil citlivostí druhově specifický, protože různé kmeny stejného druhu mohou k danému léčivu vykazovat citlivost i rezistenci. Ve všech případech má tedy nezastupitelnou roli ve volbě terapie testování citlivostí k antimykotikům relevantní metodikou. (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2014).

A. fumigatus je nejčastějším původcem mykotických plicních infekcí, včetně invazivní, chronické pulmonární i alergické bronchopulmonární aspergilózy, a také aspergilomu (Latgé, 1999, Repentigny *et al.*, 2002, Chowdhary *et al.*, 2017). Proto se tato bakalářská práce věnuje především tomuto druhu.

2.2 Léčba

Antifungálních léčiv, která jsou vhodná pro léčbu invazivních mykotických infekcí bylo doposud uvedeno do praxe pouze malé množství, což omezuje možnosti léčby (Peyton *et al.*, 2015).

Invazivní aspergilóza se léčí třemi základními skupinami léků: triazoly, polyeny a echinokandiny. Zároveň se v určitých případech uplatňuje i léčba chirurgická, například u aspergilomu. Naproti tomu léčba chronické pulmonární aspergilózy je především medikamentózní pomocí zmíněných skupin léčiv (Walsh *et al.*, 2008).

Azolovým léčivům se podrobně věnuje kapitola č. 3. - Azolové deriváty.

Amfotericin B má dvojitý účinek. Hlavní mechanismus působení léčiva je jeho navázání na ergosterol v plasmatické membráně hub, čímž dojde k jejímu narušení a buněčné smrti. Druhý mechanismus způsobuje zvýšenou membránovou permeabilitu a sekvestraci plasmatické membrány, což podporuje účinek ostatních skupin léčiv, která se snáze dostávají do buňky (Wilcock *et al.*, 2012).

Echinokandiny redukují růst hyf (Kurtz *et al.*, 1994) cestou inhibice 1,3- β -glukan syntázy, což zabrání polymeraci 1,3- β -glukanu, který se nachází v buněčné stěně hub a je spolu s chitinem jejím hlavním polysacharidem. Tím se buněčná stěna poškodí, nastane osmotická

fragilita a lýza buňky. Prvním léčivem z této skupiny používaným v praxi, byl kaspofungin, který je mimo jiné účinný také proti *A. fumigatus* (Letscher-Bru & Herbrecht, 2003).

V případě, že pacient nereaguje na léčbu azolovými léčivy je možné změnit třídu léčiv na zmíněný amfotericin B, nebo kaspofungin. Zároveň je také možná kombinovaná léčba, která zahrnuje více tříd léčiv. Zatím jsou její výsledky ale nedostatečně klinicky podložené (Walsh *et al.*, 2008).

Léčbu a prognózu pacienta komplikuje především opožděná diagnóza, rezistence patogena, další onemocnění u stejného pacienta a lékové interakce, nebo lokalizace infekce (např. mozek), kdy je nutné vybrat správné léčivo a jeho formu z důvodů odlišné farmakokinetiky (Verweij *et al.*, 2009). Zvyšující se počet rezistentních nebo dokonce multirezistentních kmenů (vůči více léčivům z odlišných tříd antimykotik) je v současnosti jednou z největších komplikací, se kterou je nutné se v klinické praxi vypořádat.

3 Azolové deriváty

Azolové deriváty jsou sloučeniny, které obsahují jeden a více 1,2,4-triazolových kruhů. Prvními klinicky užívanými triazoly byly itraconazol a flukonazol. Vývoj jejich derivátů přinesl vylepšenou generaci, a to především vorikonazol, posakonazol, isavukonazol a další. Jsou to jedny z nejvíce účinných látek s antifungálním účinkem, ale i přes to mají své nedostatky jako jsou vedlejší účinky a riziko vzniku rezistence při dlouhodobém užívání (Maertens, 2004, Peyton *et al.*, 2015). Od roku 1990 jsou však azoly nejčastěji užívané látky k léčbě i prevenci akutní a také chronické pulmonární aspergilózy (Verweij *et al.*, 2015).

V praxi jsou nejčastěji používána tři triazolová léčiva (Kaye & Miller, 2006). Itraconazol je používán především pro léčbu alergické bronchopulmonární a chronické pulmonární aspergilózy (Denning *et al.*, 2003). Vorikonazol je užíván v případě invazivní aspergilózy (Walsh *et al.*, 2008), a jako jediný z těchto tří triazolových léčiv nemá fungistatický, ale fungicidní účinek (Quereda & Cossart, 2017). Posakonazol se často užívá také v profylaxi invazivní aspergilózy u rizikových pacientů (Walsh *et al.*, 2008).

Bylo prokázáno, že se úmrtnost pacientů s invazivní aspergilózou, u kterých byla započata vhodná a včasná léčba vorikonazolem pohybovala okolo 24 %, kdežto úmrtnost u pacientů, kteří dostávali nevhodnou léčbu se pohybovala okolo 47 %. V případě, že byl patogen u pacientů rezistentní vůči vorikonazolu, se mortalita zvýšila o 21 % 42. den a o 25 % 90. den po započetí léčby oproti kontrolní skupině (Lestrade *et al.*, 2018).

3.1 Mechanismus účinku

Azoly působí intracelulárně a inhibují biosyntetickou dráhu ergosterolu. Inhibují enzym cytochrom P450-dependentní C-14- α -demetylázu, který je kódovaný genem *cyp51*, a který je zodpovědný za syntézu ergosterolu. Tento enzym transformuje lanosterol na 4,4'-dimetylcholesta-8,14,26-trien-3-beta-ol. Léčba vede ke snížení produkce ergosterolu a ke zvýšení hladiny metylsterolů, které jsou toxické a způsobují dezintegraci membrány a plazmolýzu. Akumulace toxických metylsterolů a chybějící ergosterol v buněčných membránách tedy vede k buněčné smrti nebo k inhibici růstu buněk hub (Jensen, 2016; Quereda & Cossart, 2017).

4 Fungální rezistence k azolovým derivátům

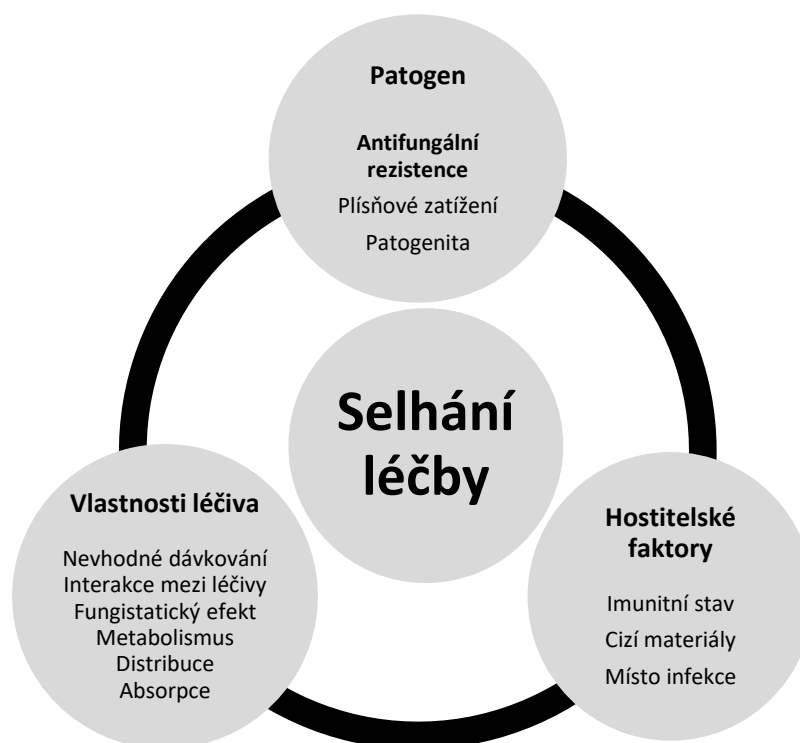
Patogenní vláknité houby jsou v některých prostředích dlouhodobě a pravidelně vystavovány vysokým koncentracím azolových derivátů, což vede k selekci kmenů se sníženou citlivostí a rozvoji rezistence. Mezi taková prostředí patří zemědělská půda ošetřovaná fungicidy, sklady surovin (např. dřeva) nebo těla pacientů léčených dlouhodobě antimykotiky. Díky selekčnímu tlaku tedy přežijí pouze kmeny, které se přizpůsobily a jejich počet v prostředí tím pádem stoupá (Balkis *et al.*, 2002, Jensen, 2016, Berger *et al.*, 2017).

Typů rezistence k azolovým derivátům existuje několik. Jednotlivé kmeny mohou vykazovat rezistenci vůči všem azolovým léčivům (pan-azol rezistentní), nebo více než k jednomu azolovému léčivu (multi-azol rezistentní), nebo mohou být rezistentní pouze k jedinému azylovému léčivu (itraconazol, vorikonazol nebo posakonazol rezistentní). Dále byly na základě *in vitro* testování stanoveny hraniční hodnoty MIC (Minimální Inhibiční Koncentrace), které určují zda je kmen citlivý, rezistentní nebo s částečnou rezistencí, viz Tabulka 1. (Verweij *et al.*, 2009).

Tabulka 1. Hodnoty MIC určující citlivost nebo rezistenci k azolovým léčivům u *Aspergillus fumigatus* (mg l⁻¹)

Lék	Citlivý	Středně citlivý	Rezistentní
Itrakonazol	<2	2	>2
Vorikonazol	<2	2	>2
Posakonazol	<0,5	0,5	>0,5

Převzato a upraveno z (Verweij *et al.*, 2009).



Obrázek 1. Schéma vlivu léčiva, patogenu a hostitele na selhání léčby

Převzato a upraveno z (Jensen, 2016).

4.1 Vznik a šíření rezistence

Nárůst počtu pacientů s aspergilózou, kterou způsobují rezistentní kmeny *A. fumigatus* potvrzuje spousta studií. Například před rokem 2004 byl výskyt rezistentních kmenů u pacientů 1 %, kdežto od roku 2004 se počet zvedl na 8 %. Velká část kmenů byla rezistentní vůči několika azolovým léčivům současně (Howard *et al.*, 2009).

4.1.1 Vznik rezistence

Jedna z prvních studií zachycující výskyt rezistentních kmenů *A. fumigatus* vyšla roku 1997. Do té doby bylo publikováno minimum prací na toto téma, což souvisí také s tím, že nebyly stanoveny hraniční hodnoty (breakpoints), od kterých se dá považovat kmen za rezistentní. Konkrétně šlo o rezistenci vůči itraconazolu u pacienta s AIDS, u kterého se rozvinula invazivní pulmonární aspergilóza a u pacienta s Hodgkinovým syndromem, u kterého se vyvinula aspergilová perikarditida (Denning *et al.*, 1997).

Jsou dva hlavní způsoby vzniku rezistence. Pravděpodobně nejčastějším způsobem je dlouhodobé vystavení mikroorganismů na polích s plodinami azolovým fungicidům (Dunne *et al.*, 2017). Méně častý, ale taktéž důležitý způsob vzniku je dlouhodobé užívání azolových léčiv například při dlouhotrvající léčbě nebo při profylaxi aspergilózy (Arendrup *et al.*, 2010).

Teprve nedávno bylo prokázáno, že rezistence u kmenů *A. fumigatus*, které mají mutace v genu *cyp51A* může souviset s užíváním triazolových fungicidů v zemědělství, kde se užívají jako nejběžnější fungicidy v boji proti fytopatogenním houbám (Price *et al.*, 2015). Tuto hypotézu podporuje řada faktů. Například ve sklenících ošetřovaných azolovými pesticidy byly nalezeny rezistentní kmeny, se stejnými mutacemi jako se vyskytují u pacientů dlouhodobě léčených azolovými deriváty (Ren *et al.*, 2017). Rezistentní kmeny s těmito mutacemi byly nalezeny také u pacientů, kteří nikdy azolovým léčivům vystaveni nebyli. Proto se předpokládá, že se nakazili kmenem, u něhož se rezistence vyvinula ve vnějším prostředí. Tento předpoklad podporuje i fakt, že se mutace TR/L98H (podrobněji ji rozebírá kapitola Mechanismus rezistence) je nacházena jak ve kmenech izolovaných z environmentálního prostředí, tak z pacientů, kteří nebyli v předchorobí léčení azolovými deriváty. Zároveň se tato mutace vyskytuje v obou prostředích nejčastěji ze všech mutací (Snelders, 2012). Je téměř jisté, že právě tento mechanismus vzniku rezistence je nejčastější, a tudíž i největší hrozbou (Chowdhary *et al.*, 2013, Dunne *et al.*, 2017, Snelders, *et al.*, 2009).

Rezistentním kmenem nemusí být pacient nakažen od počátku onemocnění. Byly popsány případy, kdy se rezistence u klinických kmenů vyvinula až v průběhu dlouhodobé léčby. První doložený případ, kdy došlo ke vzniku rezistence během kombinované léčby azolovým léčivem a echinokandinem byla publikována roku 2010 (Arendrup *et al.*, 2010).

Molekulární podstata vzniku rezistence na triazolová léčiva byla v posledním desetiletí intenzivně zkoumána, avšak stále se najdou aspekty, které je třeba detailněji prozkoumat, chceme-li plně porozumět mechanismu vzniku rezistence.

4.1.2 Šíření rezistence

Většina studií týkajících se šíření rezistence pochází z Evropy. Jedna z prvních studií v Evropě, která popisuje nárůst počtů rezistentních kmenů z klinického prostředí vůči itraconazolu v Nizozemí v letech 1994-2007 hlásila zvýšení z 1,7 % na 6 %. Během 90. let byly také vydány studie věnující se rezistenci z Francie a Švédska, a roku 2001 z Norska (Verweij *et al.*, 2008). Od té doby počet zpráv o rezistenci začal narůstat globálně (Meis *et al.*, 2016).

O dalším nárůstu svědčí i výsledky novější studie z Nizozemí (Lestrade *et al.*, 2016), která zkoumala míru rezistence u klinických izolátů *A. fumigatus* z roku 2013 z 16 nemocnic. Míra rezistence se pohybovala od 5 % do 10 %. U rizikových pacientů (pacienti neodpovídající na léčbu azoly, nebo imunosuprimovaní pacienti a antimykotickou profylaxií) dosahovala rezistence dokonce až 30 %.

Dle studie, která testovala klinické izoláty z imunosuprimovaných pacientů v různých zemích světa v období od roku 2009, do roku 2011, byla stanovena četnost azolové rezistence u *A. fumigatus* mezi 0,6 % až 4,2 % s občasnými výchyly (Linden *et al.*, 2015). Zajímavostí je, že v Rakousku byl mezi 338 klinickými izoláty *A. fumigatus*, které byly izolovány mezi lety 2008 a 2018, a u nichž byly zjišťovány citlivosti k antimykotikům (v Rakousku povinné ze zákona), objeven pouze jediný izolát rezistentní k azolům. Celkově tedy byla rezistence tohoto druhu mnohem méně častá než tomu je u většiny ostatních států (Lass-Flörl *et al.*, 2018). Je možné, že je to způsobené zodpovědnějším přístupem k využívání azolových fungicidů v zemědělství.

Tabulka 2. Prevalence azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus* v klinickém materiálu v různých evropských zemích

Stát	Prevalence rezistence %	Citace
Belgie	5,5	Vermeulen <i>et al.</i> , 2015
Dánsko	5	Jensen <i>et al.</i> , 2016
Německo	3,2	Bader <i>et al.</i> , 2013
Nizozemí	5,3	Linden <i>et al.</i> , 2011
Polsko	4,13	Nawrot <i>et al.</i> , 2017
Řecko	2,7	Arabatzi <i>et al.</i> , 2011
Velká Británie	2,2	Abdolrasouli <i>et al.</i> , 2018
Španělsko	1,95	Escribano <i>et al.</i> , 2013
Turecko	10,2	Özmerdiven <i>et al.</i> , 2015

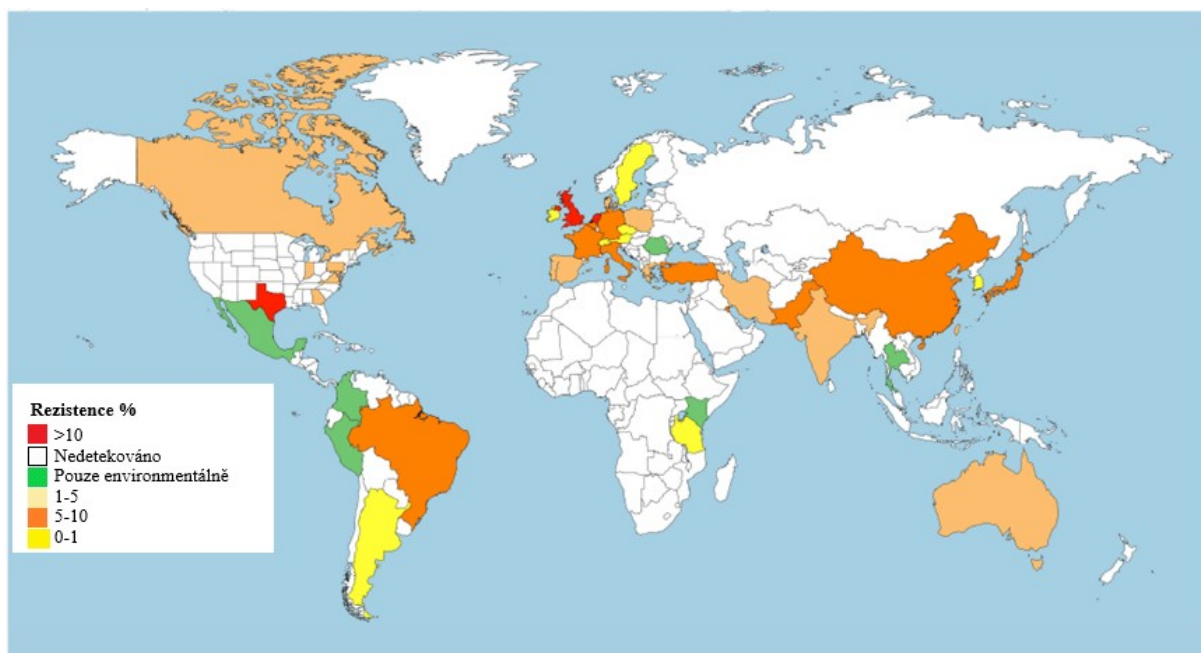
Jedna z prvních mimoevropských studií prokazující azolovou rezistenci byla studie z Číny z roku 2011. Týkala se mutace TR₃₄/L98H, kterou prokázala jako první mimoevropská studie (Lockhart *et al.*, 2011). Následovaly další země prokazující azolovou rezistenci, které jsou shrnuté v Tabulce 3.

Tabulka 3. Prevalence azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus* v klinickém i environmentálním prostředí v mimoevropských zemích

Stát	Prevalence rezistence %	Citace
Austrálie	3,1	Kidd <i>et al.</i> , 2015
Čína	5,8	Lockhart <i>et al.</i> , 2011
Indie	1,7	Chowdhary <i>et al.</i> , 2015
Írán	3,2	Syedmousavi <i>et al.</i> , 2013
Japonsko	6,1	Tashiro <i>et al.</i> , 2012
Kolumbie	9,3	Alvarez-Moreno <i>et al.</i> , 2017**
Tanzánie	13,9	Chowdhary <i>et al.</i> , 2014**
Thajsko	3,2	Tangwattanachuleeporn <i>et al.</i> , 2017**
USA	5,6	Wiederhold <i>et al.</i> , 2016

**studie zkoumající environmentální izoláty

Z Tabulky 2, Tabulky 3 a Obrázku 2 můžeme vyvodit, že je Evropa nejvíce prozkoumanou částí světa z hlediska výskytu azolové rezistence, a že se od zbytku světa nikterak zásadně neliší v prevalenci rezistence. Dále můžeme říct, že téměř všechny kontinenty mají jak oblasti, kde je nízká incidence rezistence, tak oblasti, kde je incidence vysoká. Toto tvrzení se týká všech kontinentů, kromě Austrálie, kde byl proveden výzkum založený na klinických vzorcích z více oblastí, a Afriky, kde byla incidence rezistence v klinickém prostředí studována pouze v Tanzánii, a také Antarktidy, kde žádný výzkum neproběhl.



Obrázek 2. Globální prevalence azolové rezistence u klinických i environmentálních izolátů *Aspergillus fumigatus* Míra prevalence byla stanovena pouze u klinických vzorků. Žlutě byly označeny státy, ve kterých bylo nahlášeno pouze několik případů. Státy označené červeně, nebo světlou a tmavou oranžovou barvou většinou hlásily výskyt rezistence i v environmentálním prostředí. Z mapy vyplývá, že nejvyšší četnost rezistence byla zaznamenána v Nizozemí, Velké Británii a Texasu. Zároveň mapa poukazuje na to, jak vysoký počet států není prozkoumán. Převzato a upraveno z (Lestrade *et al.*, 2019).

Doposud není zcela jasné, jak se rezistence šířila z prvních nálezů. Dále není objasněno, jestli se jednotlivé mutace vyvinuly jednou a poté se šířily, nebo zdali se daná mutace vyvinula vícekrát na různých lokalitách nezávisle na sobě. I přes to, že byla rezistence detekována na 6 kontinentech, data z mnoha oblastí chybí a pro další výzkum by bylo vhodné je získat, a tím přispět k celkovému porozumění vzniku a šíření rezistence.

4.2 Molekulární mechanismy rezistence

Byly popsány tři hlavní mechanismy rezistence u rodu *Aspergillus*:

- 1) Bodové mutace v genu *cyp51*
- 2) Zvýšená exprese genu *cyp51*
- 3) Zvýšená exprese genů kódujících efluxní pumpy

Genom *A. fumigatus* obsahuje dvě isoformy genu *cyp51* a to *cyp51A* a *cyp51B*. (Mellado *et al.*, 2001). Isoformy proteinů kodovaných těmito geny vykazují odlišné kinetické vlastnosti a odlišnou citlivost k azolům (Warrilow *et al.*, 2010). Enzymy CYP51 se podílejí na biosyntéze ergosterolu, který je nepostradatelnou součástí membrán vláknitých hub. Jeho nedostatek

negativně ovlivňuje především propustnost a fluiditu membrány. V buňkách vláknitých hub má také hormonální účinek, stimuluje růst a proliferaci (Lepesheva & Waterman, 2007, Becher & Wirsal, 2012, Price *et al.*, 2015).

Aktivní místo cytochromu P450 obsahuje hemové centrum s dvojmocným železem. Železo je konjugováno k proteinu prostřednictvím cysteinu. Tento cystein a několik sousedních zbytků je ve všech známých eukaryotních CYP enzymech silně konzervativní. Enzym typicky katalyzuje nejprve vstup kyslíku do metyl skupiny vázané na uhlíku C₁₄ sterolu, vzniká tak alkohol. Ten je poté oxidován na aldehyd, který v posledním kroku odstupuje za vzniku konjugované dvojné vazby mezi uhlíky C₁₄ a C₁₅. Reakce typicky zahrnují NADPH+H⁺ jako donor elektronů a NADPH cytochrom P450 reduktázu jako redoxního partnera (Becher & Wirsal, 2012; Lepesheva & Waterman, 2007; Waterman & Lepesheva, 2005).

Rezistence k azolům je většinou způsobená aminokyselinovými substitucemi v genu *cyp51*. Je několik způsobů změny sekvence, které vedou k rezistenci. Například změna konformace nebo odstranění aminokyseliny v místě, které interaguje s azolovým derivátem, nebo strukturální změny zahrnující změnu polohy hemové skupiny, což také naruší interakci s azoly. Tyto změny mohou vést ke změně enzymatické aktivity, a tudíž k narušení produkce ergosterolu. Avšak díky velké flexibilitě struktury proteinu nemusí k těmto negativním změnám dojít. Některé substituce v aminokyselinové sekvenci *cyp51* totiž zároveň způsobují odolnost vůči azolům a nenarušují výrazně produkci ergosterolu (Becher & Wirsal, 2012).

Plasticita exprese genů u *A. fumigatus* je obrovská. Již během 60 minut, při kterých je houba vystavena itraconazolu, změní transkripci řady genů natolik, že se výrazně zlepší homeostáza, což umožní přežití nepříznivých podmínek (Hokken *et al.*, 2019).

Nejčastější mechanismus rezistence v klinickém i enviromentálním prostředí je mutace TR₃₄/L98H (Chowdhary *et al.*, 2013). Kmeny s touto mutací mohou být rezistentní vůči všem triazolovým léčivům, a vyskytují se celosvětově. Změny vedoucí k rezistenci u mutace TR₃₄/L98H zahrnují tandemové repeticce v promotoru genu kombinované s bodovými mutacemi v genu *cyp51*. Tento mechanismus rezistence je nejčastější a zahrnuje 34 párů bází dlouhou tandemovou repetici v promotoru *cyp51* se substitucí leucinu v pozici 98 za histidin přímo sekvenci enzymu. Tyto změny způsobují zvýšenou expresi (overexpresi) *cyp51*, která vede k rezistenci (Mellado *et al.*, 2007; Verweij *et al.*, 2007)

Další velmi častý mechanismus rezistence, který se projevuje především rezistencí vůči vorikonazolu zahrnuje 45 párů bází dlouhou tandemovou repetici v promotoru genu, substituci tyrosinu 121 za fenylalanin a theronin 289 za alanin – TR₄₆/Y121F/T289A (Linden *et al.*, 2013).

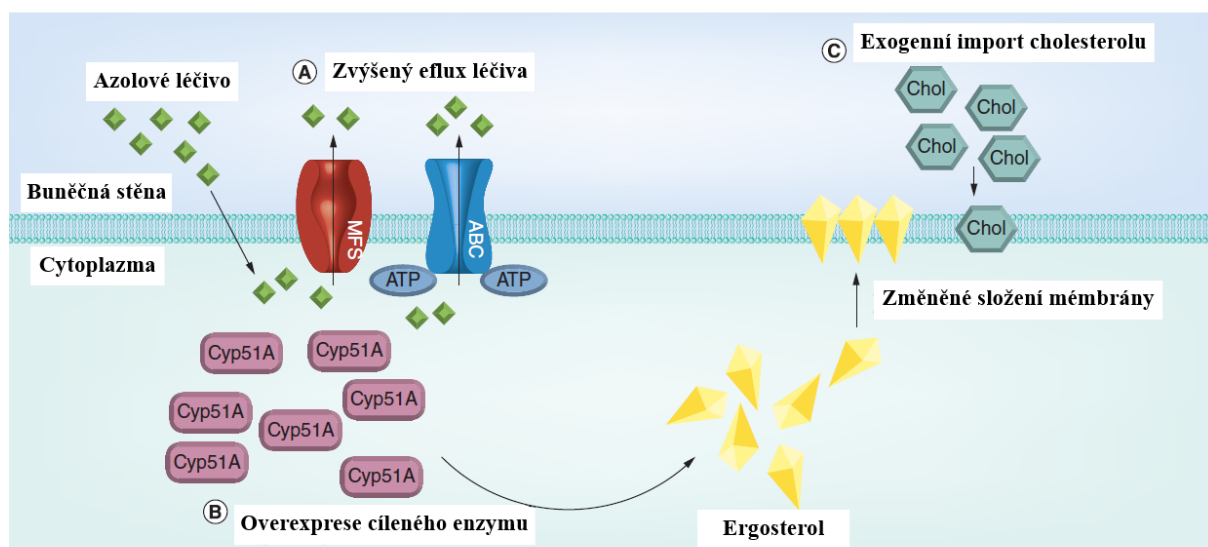
V tomto roce byl objeven unikátní mechanismus rezistence k azolům TR₁₂₀. Jedná se o změnu, která se nachází pouze v promotoru genu *cyp51A*. Tento promotor má 120 párů bází dlouhou tandemovou repetici. Gen sám nezahrnuje žádné substituce, které se nachází přímo v něm. (Hare *et al.*, 2019).

Bylo zjištěno, že také gen *cyp51B* může být nadměrně exprimován v rezistentních izolátech *A. fumigatus*, které postrádají mutace v genu *cyp51A*. CYP51B je enzym (cytochrom P450), který je taktéž inhibován azoly, a tudíž zvýšená exprese, nebo mutace v genu, které vedou ke snížení interakcí enzymu s azoly, poskytují možný základ pro rezistenci. Hladiny nadměrné exprese jsou srovnatelné s hladinami pozorovanými u izolátů rezistentních na azoly prostřednictvím mutací v *cyp51A*. Avšak pro lepší objasnění tohoto mechanismu je nutné provést další výzkum (Buied *et al.*, 2013).

Existují ale také mechanismy, které nesouvisí s mutacemi v genu *cyp51*. Patogenní vláknité houby dovedou překonat akumulaci toxických metylsterolů nadměrnou expresí efluxních pump, zejména ATP vázajícími kazetovými transportéry (ABC) a superrodinou transportních membránových proteinů MFS (major facilitator superfamily) (Savoldi *et al.*, 2006, Paul, Diekema & Moye-Rowley, 2017). Zvýšená exprese efluxních pump tedy také vede k rezistenci, což potvrdila již studie z roku 1997, kde autoři prokázali, že nadměrná exprese transportérů AfuMDR1 a AfuMDR2 vedla k azolové rezistenci u *A. fumigatus* (Tobin *et al.*, 1997).

Další méně častý molekulární mechanismus rezistence k azolům je včlenění exogenního cholesterolu z hostitele do plazmatických membrán patogena. Tímto způsobem si patogen částečně kompenzuje funkci chybějícího ergosterol. Ve studii (Xiong *et al.*, 2005) bylo prokázáno snížení účinnosti itakonazolu proti *A. fumigatus*, pokud byl v kultivačním médiu přítomen cholesterol.

Také mutace P88L v *HapE* genu způsobuje rezistenci. Gen *HapE* kóduje CCAAT-vázající podjednotku proteinového Hap-komplexu, který slouží jako transkripční faktor. Kromě HapE se Hap-komplex skládá z alespoň dvou dalších podjednotek HapB a HapC. Tento komplex rozpoznává regulační CCAAT element, který se nachází v přímé, nebo reverzní orientaci v promotorových oblastech četných eukaryotických genů. HapE se skládá ze 4 exonů a mutace P88L se nachází ve čtvrtém exonu, což má zásadní vliv na funkci proteinu (Camps *et al.*, 2012, Hortschansky *et al.*, 2007, Kato, 2005, Tanoue *et al.*, 2006). Nejen že je zodpovědná za rezistenci, ale zároveň způsobuje snížení fitness rezistentního kmenu (Camps *et al.*, 2012), což se projevuje například pomalejším růstem nebo sníženou expresí genu *cyp51A* (Arendrup *et al.*, 2010).



Obrázek 3. Základní molekulární mechanismy azolové rezistence u *Aspergillus fumigatus*

Převzato a upraveno z (Chowdhary, Sharma, Hagen, *et al.*, 2014).

Stále se ale vyskytují případy (až 10 %), kdy se některé kmeny *A. fumigatus* nenachází v přirozené, nemutované formě pro zmíněné geny (WT – wild type), a i přes to vykazují rezistenci k azolům. U těchto případů tedy ještě nebylo zjištěno, jaké molekulární mechanismy jsou zodpovědné za rezistenci (Jensen, 2016)

4.2.1 Mutace v cílových genech a jejich rozšíření

Jak bylo zmíněno v předchozí kapitole, mutace v genu *cyp51A* představují nejčastější mechanismus rezistence k azolovým derivátům jak v klinickém, tak v environmentálním prostředí (Becher & Wirsal, 2012). Výskyt několika desítek různých mutací ve světě mapuje Tabulka 4 a Tabulka 5.

Tabulka 4. Globální rozšíření rezistence k azolům u klinických kmenů *Aspergillus fumigatus* a zjištěné molekulární mechanismy

Stát	Počet rezistentních izolátů/Počet zkoumaných izolátů	Mechanismus rezistence	Citace
Čína	4/6	M220I, G54R	Chen <i>et al.</i> , 2005
Velká Británie	6	G138C	Howard <i>et al.</i> , 2006
Nizozemí	12/13	TR ₃₄ /L98H	Verweij <i>et al.</i> , 2007
Nizozemí	14	TR ₃₄ /L98H, S297T, F495I	Mellado <i>et al.</i> , 2007
Nizozemí	41/1912	TR ₃₄ /L98H, M220V	Verweij <i>et al.</i> , 2008
Velká Británie	34/519	TR ₃₄ /L98H, F46, M172V, E427K, G54E, G138C, G448S, H147Y, G448S, P216L, M220, F46Y, M172V, E427K, N248T a D255E, Y431C, G434C, M172V, E427	Howard <i>et al.</i> , 2009
Nizozemí	1	TR53	Hodiamont <i>et al.</i> , 2009
Maroko	2/4	G448S	Bellete <i>et al.</i> , 2010
Japonsko	1/19	F332K	Asano <i>et al.</i> , 2011
Nizozemí	82/1792	TR ₃₄ /L98H, G54W, P216L, F219I, F46Y, G89G, M172V, N248T, D255E, L358L, E427K, C454C	Linden <i>et al.</i> , 2011
Nizozemí	4	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Kuipers <i>et al.</i> , 2011
Belgie	1	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Jeurissen <i>et al.</i> , 2011
Velká Británie	8	G138C, Y431C, G434C	Albarrag <i>et al.</i> , 2011
Japonsko	16/154	G54E, G54R, G54W	Tashiro <i>et al.</i> , 2012
Nizozemí	4	P88L v HapE	Camps <i>et al.</i> , 2012
Německo	1	TR ₃₄ /L98H	Hamprecht <i>et al.</i> , 2012
Německo	1	TR ₃₄ /L98H	Rath <i>et al.</i> , 2012
Belgie	1	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Vermeulen <i>et al.</i> , 2012
Indie	1/103	TR ₃₄ /L98H	Chowdhary <i>et al.</i> , 2012
Španělsko	1	G448S	Pelaez <i>et al.</i> , 2012
Nizozemí	63/921	TR ₄₆ /Y121F/T289A, TR ₃₄ /L98H	Linden <i>et al.</i> , 2013
Írán	4/124	TR ₃₄ /L98H	Seyedmousavi <i>et al.</i> , 2013
Dánsko	7/11	TR ₄₆ /Y121F/T289A, TR ₃₄ /L98H, TR ₃₄ /L98H, S297T a F495I	Hassan <i>et al.</i> , 2014
Belgie	1	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Montesinos <i>et al.</i> , 2014
Japonsko	8	P216L	Hagiwara <i>et al.</i> , 2014
Nizozemí	21/105	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/ T289A	Fuhren <i>et al.</i> , 2015
Německo	8/27	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Steinmann <i>et al.</i> , 2015
Nizozemí	47/60	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A, M220I, ABPA: TR ₃₄ /L98H, TR ₃₄ /L98H, CPA/ABPA: M220K, E317G, P381R, D481E, CPA: L77V, L399I, D481E, M220I, L319V, G54R, M220R, G54E, G54W, Q249H, L329V	Linden <i>et al.</i> , 2015
Taiwan	3/38	TR ₃₄ /L98H, TR ₃₄ /L98H, S297T, F495I	Steinmann <i>et al.</i> , 2015

Francie	3/165	TR ₃₄ /L98H	Choukri <i>et al.</i> , 2015
Indie	12/685	TR ₃₄ /L98H, G54E, F46Y, D255E, M172V	Chowdhary <i>et al.</i> , 2015
Francie	7/14	TR ₄₆ /Y121F/T289A, F46Y, G89G, M172V, N248T, D255E, L358L, E427K, C454C,	Lavergne <i>et al.</i> , 2015
USA	26/220	TR ₄₆ /Y121F/T289A, TR ₃₄ /L98H	Wiederhold <i>et al.</i> , 2016
Nizozemí	10/38	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Paassen <i>et al.</i> , 2016
USA	1	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Vazquez <i>et al.</i> , 2016
Tanzanie	5/44	TR ₃₄ /L98H	Mushi <i>et al.</i> , 2016
Dánsko	64/1098	TR ₃₄ /L98H, P216L, M220K, G54W	Jensen <i>et al.</i> , 2016
Japonsko	1	TR ₃₄ /L98H	Toyotome <i>et al.</i> , 2016
Čína	2/144	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A, TR ₃₄ /L98H/S297T/F495I, D343N, I242V, K314T, D262Y, F46Y/M172V/E427K	Chen <i>et al.</i> , 2016
Německo	2/77	TR ₃₄ /L98H	Koehler <i>et al.</i> , 2017
Francie	1	TR ₄₆ /Y121F/T289A	Lavergne <i>et al.</i> , 2017
USA	37/290	Y46F, V172M, I242V, T248N, E255D, K427E	Heo <i>et al.</i> , 2017
Polsko	5/121	TR ₃₄ /L98H, G333C, G393A, C672T	Nawrot <i>et al.</i> , 2017
Itálie	13/423	TR ₃₄ /L98H, F219I	Prigitano <i>et al.</i> , 2017
Thajsko	13/308	TR ₃₄ /L98H, G54R	Tangwattanachuleeporn <i>et al.</i> , 2017
Velká Británie	7/356	TR ₃₄ /L98H, ostatní mutace nebyly zkoumány	Abdolrasouli <i>et al.</i> , 2018
Portugalsko	10/227	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A, F46Y/M172V/N248T/D255E/E427K	Pinto <i>et al.</i> , 2018
Švýcarsko	2/160	TR ₃₄ /L98H	Riat <i>et al.</i> , 2018
Polsko	6/121	TR ₃₄ /L98H	Nawrot <i>et al.</i> , 2018
Korea	1	TR ₃₄ /L98H/S297T/ F495L	Lee <i>et al.</i> , 2018
Mexiko	2/24	TR ₃₄ /L98H	Gonzalez-Lara <i>et al.</i> , 2019

Část tabulky převzata z (Chowdhary, Sharma, & Meis, 2017) a doplněna o novější zdroje.

Z Tabulky 4 je možné vyvodit, že nejčastější mutací nacházející se v klinickém prostředí je TR₃₄/L98H, jelikož byla prokázána ve většině uvedených studií. Evidována je v Evropě, Asii, Africe a Severní i Jižní Americe. Další velmi častou mutací je TR₄₆/Y121F/T289A, která byla nalezena mezi klinickými izoláty v Evropě, Asii a Severní Americe. Tyto dvě mutace se často vyskytují najednou ve stejné oblasti. Taktéž velká část zbývajících známých mutací se vyskytuje celosvětově a není tedy vázaná pouze na jednu oblast.

Co se týká procentuálního poměru rezistentních izolátů ku všem izolátům, je nejvyšší poměr v Nizozemí. Tabulka 4 poukazuje také na to, že se nejvíce studií týká Evropy. Ostatní kontinenty v počtech publikací zaostávají, avšak neznamená to, že by se na jejich území rezistentní kmeny nevyskytovaly.

Tabulka 5. Globální rozšíření rezistence k azolům u environmentálních kmenů *Aspergillus fumigatus* a zjištěné molekulární mechanismy rezistence

Stát	Počet rezistentních izolátů/Počet zkoumaných izolátů	Mechanismus rezistence	Citace
Dánsko	4/4	TR ₃₄ /L98H	Mortensen <i>et al.</i> , 2010
Indie	24/486	TR ₃₄ /L98H	Chowdhary <i>et al.</i> , 2012
Írán	5/150	TR ₃₄ /L98H	Badali <i>et al.</i> , 2013
Indie	14/105	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Chowdhary <i>et al.</i> , 2014
Kuwait	8/362	TR ₃₄ /L98H	Ahmad <i>et al.</i> , 2014
Kuwait	1/50	TR ₃₄ /L98H	Ahmad <i>et al.</i> , 2015
Německo	55/455	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Bader <i>et al.</i> , 2015
Írán	1	TR ₃₄ /L98H	Mousavi & Badali, 2015
Tanzánie	28/106	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A, G54E	Sharma <i>et al.</i> , 2015
Rumunsko	23/95	TR ₃₄ /L98H, G54E	Sharma <i>et al.</i> , 2015
Indie	5/52	TR ₃₄ /L98H, G54E	Sharma <i>et al.</i> , 2015
USA	38/200	TR ₃₄ /L98H	Hurst <i>et al.</i> 2017
Thajsko	10/308	TR ₃₄ /L98H, G54E	Tangwattanachuleeporn <i>et al.</i> , 2017
Japonsko	1/10	TR ₃₄ /L98H	Onishi <i>et al.</i> , 2017
Keňa	3/48	TR ₃₄ /L98H	Kemoi <i>et al.</i> , 2018
Taiwan	34/451	TR ₃₄ /L98H, TR ₃₄ /L98H/S297T/F495I	Wang <i>et al.</i> , 2018
Velká Británie	30/513	TR ₃₄ /L98H	Tsitsopoulou <i>et al.</i> , 2018
Brazílie	6/20	TR ₃₄ /L98H	Bedin Denardi <i>et al.</i> , 2018
Kolumbie	15/34	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Alvarez-Moreno <i>et al.</i> , 2019
Velká Británie	19/131	TR ₃₄ /L98H, TR ₄₆ /Y121F/T289A	Sewell <i>et al.</i> , 2019

Environmentální výskyt mutací vedoucích k rezistenci vůči azolům je zkoumán o poznání méně než výskyt v klinickém materiálu. Každá ze zmíněných studií v Tabulce 5 potvrdila výskyt mutace TR₃₄/L98H. Tato mutace se tedy vyskytuje v environmentálním prostředí na všech kontinentech, kromě Antarktidy. V pěti studiích z 21, byl potvrzen výskyt mutace TR₄₆/Y121F/T289A. Ve stejném počtu studií byla zjištěna i mutace G54E. Ta se ale liší v incidenci v porovnání s klinickými izoláty. První dvě zmíněné mutace tedy převažují v obou prostředích, což potvrzuje fakt, že mutace, které se vyvinuly v environmentálním prostředí radikálně ovlivňují mutace v prostředí klinickém. Tím pádem jsou data z environmentálního prostředí velmi důležitá a je potřeba jich získat více z co největšího počtu oblastí.

4.3 Detekce rezistentních kmenů v praxi

Odborné instituty a společnosti CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) a EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) vyvinuly referenční metody pro testování antifungální citlivosti *in vitro*. Definovali gen *cyp51* v přirozené, nemutované formě (WT – wild type) a minimální inhibiční koncentrace (MIC) za účelem stanovení epidemiologických mezních hodnot (Espinell-Ingroff *et al.*, 2010, Rodriguez-Tudela *et al.*, 2008). Poté byly stanoveny hraniční koncentrace určující citlivost k azolovým léčivům u *A. fumigatus* - Fungální rezistence k azolovým derivátům - Tabulka 1. Dle těchto základních stanovených hodnot se řídí většina pracovišť, testujících rezistenci u *A. fumigatus*.

Zmíněné metody testování citlivosti však mohou zabrat delší dobu, navíc je potřeba v některých případech detekovat i jednotlivé druhy mutace. Molekulární diagnostika může efektivně a rychle definovat mechanismus rezistence a identifikovat rezistentní kmeny. Velice efektivní je metoda PCR v reálném čase s využitím alelicky specifických molekulárních sond (Garcia-Effron *et al.*, 2008). Pro nejčastější způsob rezistence – mutace v *cyp51A* genu je většinou užívaná právě metoda RT-PCR (real time PCR) amplifikace celého genu i s jeho promotorem (Dudakova *et al.*, 2017).

Standardizované metody, které by zahrnuly pro screening všech druhů vzorků aspergilů z environmentálního prostředí doposud nejsou stanoveny. Způsobeno to je především heterogenitou vzorků, které mohou pocházet z půdy, ze vzduchu, z rostlinného materiálu, nebo z povrchových stěrů. Při screeningu jsou kmeny *A. fumigatus* většinou inkubovány při teplotách 43 °C a vyšších, jelikož je tento druh vysoce termotolerantní. I přes to se ale najdou druhy hub, a to především tropické, které také mohou růst na agarovém médiu při vysokých teplotách. Koncentrace azolových derivátů pro screening se v agarových destičkách pohybují od 0,5 g/ml pro posakonazol, a do 1 až 4 g/ml pro intrakonazol a vorikonazol. Doporučené je testovat vorikonazol a intrakonazol zároveň na jedné destičce, aby byly pokryty doposud známé fenotypy rezistence (Dudakova *et al.*, 2017, Garcia-Effron *et al.*, 2008).

5 Závěr

Aspergillus je rod vláknitých hub, který způsobuje nemoc zvanou aspergilóza. Toto onemocnění má vysokou mortalitu a pokud je jeho původcem rezistentní kmen, mortalita se dále zvyšuje (Judson & Walsh, 2000; Lestrade *et al.*, 2018).

První údaj o aktivitě azolových derivátů pochází z roku 1944. Avšak až roku 1981 začalo být užíváno první azolové antimykotikum účinné proti systémovým mykotickým infekcím, triazol ketonazol. Roku 1992 začal být užíván k léčbě do dnes využívaný itraconazol, následoval vorikonazol a poté i posakonazol. Až do 90. let minulého století nebyl žádný záznam o rezistenci k azolovým léčivům (Maertens, 2004). Prevalence rezistence k azolům však postupně začala narůstat a teprve v posledním desetiletí je pozorován velmi výrazný nárůst počtu rezistentních kmenů *Aspergillus* (Hassan *et al.*, 2014).

Poměrně nedávno byl prokázán hlavní činitel zodpovědný za vznik rezistence k azolům. Tím je nadměrné užívání azolových fungicidů v zemědělství a ochraně surovin (Dunne *et al.*, 2017). Plasticita genů je u rodu *Aspergillus* velmi výrazná a rychlá, a tak při dlouhodobém vystavení hub azolovým derivátům vzniká velký počet rezistentních kmenů. (Hokken *et al.*, 2019) Ty se poté díky své miniaturní velikosti spor snadno rozšiřují větrem. Z polí se tedy rozšíří kmeny do okolního prostředí, kde mohou být vdechnuty imunitně oslabeným jedincem u kterého imunita není dostatečně silná na to, aby utlumila růst hyf v plicích, což vede k propuknutí infekce (Latgé, 1999, 2001). Dalším důležitým faktorem vzniku rezistence je dlouhodobé vystavení pacienta azolovým léčivům, například při profylaxi aspergilózy (Arendrup *et al.*, 2010).

Šíření rezistentních kmenů je tedy velmi jednoduché a efektivní. Žádný ze států nemůže z ekonomických důvodů při intenzivním zemědělství přistoupit na bezvýhradné užívání neazolových fungicidů (Tullion *et al.*, 2012, Linden *et al.*, 2015). Taktéž v medicíně kromě azolů, echinokandinů a polyenů, neexistují žádná jiná léčiva, která by efektivně léčila aspergilózu (Walsh *et al.*, 2008).

Molekulárních mechanismů azolové rezistence je v současné době objevených hned několik. Převažují aminokyselinové substituce v genu a okolí genu *cyp51A*. Patří sem bodové mutace v genu a v jeho promotoru (Becher & Wirsal, 2012). Nejčastější mutací je mutace TR₃₄/L98H. Ta se vyskytuje celosvětově jak v klinickém, tak v environmentálním prostředí (Snelders, 2012). Častý způsob rezistence, který nesouvisí s genem *cyp51*, je nadměrná exprese efluxních pump. Pomocí tohoto mechanismu houby překonají akumulaci toxických metylsterolů, které se vytváří při působení azolového léčiva na buňky houby (Tobin *et al.*, 1997;

Savoldi *et al.*, 2006). Další mechanismus rezistence je včlenění exogenního cholesterolu hostitele do plazmatických membrán patogena, což nahrazuje chybějící ergosterol, na jehož syntézu působí azolová léčiva (Xiong *et al.*, 2005). Nebo také mutace P88L v *HapE* genu, způsobující nejen rezistenci, ale také snížení fitness patogena (Camps *et al.*, 2012). I přes velký počet doposud zjištěných mutací a dalších mechanismů rezistence k azolům se stále vyskytují rezistentní kmeny aspergilů, u kterých neznáme mechanismus jejich rezistence (Jensen, 2016). Pochopení těchto neznámých minoritních mechanismů rezistence si zcela jistě zaslouží další studium. Prospěšné se zdá být i nařízení platné v Rakousku, kde je povinné průběžně testovat klinické vzorky aspergilů na rezistenci. Takové opatření zajišťuje neustálý přehled o epidemiologické situaci na daném území a umožňuje včas zavést případná preventivní opatření, nebo modifikovat léčebná schémata na základě aktuálních dat (Lass-Flörl *et al.*, 2018).

Zmapování četnosti výskytu rezistentních kmenů ve všech oblastech světa by napomohlo ve výzkumu vlivů zodpovědných za vznik rezistence a taktéž by objasnilo dynamiku jejího šíření. Doposud proběhlo nejvíce studií zkoumajících rezistenci aspergilů vůči azolům v Evropě, kde také incidence rezistence dosahuje nejvyšších hodnot, a to především v Nizozemí (Verweij *et al.*, 2008; Lestrade *et al.*, 2019). Avšak výskyt rezistence je již potvrzen na všech osídlených kontinentech. Zároveň by toto testování, pokud by bylo prováděno ve větší míře, pomohlo v klinickém prostředí, jelikož je léčba na rezistentní kmen jiná než na ten nerezistentní a čas je při propuknutí invazivní aspergilózy klíčovým faktorem (Lestrade *et al.*, 2018). Kromě šíření azolové rezistence je stále větším problémem zvyšující se výskyt kryptických druhů *Aspergillus*, které také způsobují aspergilózu. Tyto druhy také často vykazují přirozenou rezistenci k některým azolům a jejich spektra citlivostí k antimykotikům jsou druhově specifická, čemuž se musí přizpůsobit i léčba (Armstrong, 1989, Nedel & Pasqualotto, 2014). Léčebná schémata aspergilózy je tedy nutné neustále zdokonalovat a reagovat na konkrétní epidemiologickou situaci, či vzácné původce. Nalezení nových účinných léčiv, která by se regulovaně užívala pouze v klinické praxi, by alespoň částečně vyřešilo zmíněné problémy a snížilo vysokou mortalitu aspergilózy spojenou s rostoucím výskytem azol-rezistentních kmenů.

Je tedy hned několik oblastí pro možný budoucí výzkum a pro zmírnění dopadu šíření rezistence na zdraví populace. Jelikož je tento problém celosvětový, je potřeba vyvinout společné úsilí vědců, lékařů, veterinářů a fytopatologů rostlin prostřednictvím globálního sledování spotřeby azolů. Nadměrné užívání azolových antimykotik musí být regulováno

a sníženo jak v lékařství, tak v zemědělství. Cílem je zachovat využitelnost této třídy léčiv a fungicidů i v budoucnu a zároveň snížit incidenci rezistence ve všech prostředích.

Užívání stejných derivátů v environmentálním a klinickém prostředí je obecně velmi rizikové, v tomto případě ústí v rapidně narůstající počet rezistentních kmenů *Aspergillus* vůči veškeré léčbě ((Howard *et al.*, 2009; Hassan *et al.*, 2014). Vznik zcela multi-rezistentních kmenů představuje potencionální významný problém, vůči kterému je nutno zasáhnout co nejdříve.

6 Seznam zdrojů

- Abdolrasouli, Alireza, Michael A. Petrou, Hyun Park, Johanna L. Rhodes, Timothy M. Rawson, Luke S. P. Moore, Hugo Donaldson, Alison H. Holmes, Matthew C. Fisher, a Darius Armstrong-James. 2018. Surveillance for azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in a centralized diagnostic mycology service, London, United Kingdom, 1998-2017. *Frontiers in Microbiology* 9(2234):1–7.
- Adams, Timothy E., Johnny A. Hansen, Robyn Starr, Nicos A. Nicola, Douglas J. Hilton, a Nils Billestrup. 1998. Growth hormone preferentially induces the rapid, transient expression of SOCS-3, a novel inhibitor of cytokine receptor signaling. *Journal of Biological Chemistry* 273(3):1285–87.*
- Ahmad, Suhail, Leena Joseph, Ferry Hagen, Jacques F. Meis, a Ziauddin Khan. 2015. Concomitant occurrence of itraconazole-resistant and -susceptible strains of *Aspergillus fumigatus* in routine cultures. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(2):412–15.
- Ahmad, Suhail, Ziauddin Khan, Ferry Hagen, a Jacques F. Meis. 2014. Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environmental Research* 133:20–26.
- Alastruey-Izquierdo, Ana, Laura Alcazar-Fuoli, a Manuel Cuenca-Estrella. 2014. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia* 178:427–33.
- Albarrag, Ahmed M., Michael J. Anderson, Susan J. Howard, Geoff D. Robson, Peter A. Warn, Dominique Sanglard, a David W. Denning. 2011. Interrogation of Related Clinical Pan-Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains: G138C, Y431C, and G434C Single Nucleotide Polymorphisms in *cyp51A*, Upregulation of *cyp51A*, and Integration and Activation of Transposon *Atf1* in the *cyp51A* Promoter. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(11):5113–21.
- Alvarez-Moreno, Carlos, Rose-Anne Lavergne, Ferry Hagen, Florent Morio, Jacques F. Meis, a Patrice Le Pape. 2019. Fungicide-driven alterations in azole-resistant *Aspergillus fumigatus* are related to vegetable crops in Colombia, South America. *Mycologia* :1–8.
- Alvarez-Moreno, Carlos, Rose Anne Lavergne, Ferry Hagen, Florent Morio, Jacques F. Meis, a Patrice Le Pape. 2017. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Scientific Reports* 7(45631):1–8.

- Arabatzis, Michael, Manousos Kambouris, Miltiades Kyprianou, Aikaterini Chrysaki, Maria Foustoukou, Maria Kanellopoulou, Lydia Kondyli, Georgia Kouppari, Chrysa Koutsia-Karouzou, Evangelia Lebessi, Anastasia Pangalis, Efthimia Petinaki, Ageliki Stathi, Eleftheria Trikka-Graphakos, Erriketi Vartzioti, Aliko Vogiatzi, Timoleon-Achilleas Vyzantiadis, Loukia Zerva, a Aristea Velegraki. 2011. Polyphasic Identification and Susceptibility to Seven Antifungals of 102 *Aspergillus* Isolates Recovered from Immunocompromised Hosts in Greece. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(6):3025–30.
- Arendrup, Maiken Cavling, Paul E. Verweij, Eleftheria Mavridou, Willem J. G. Melchers, Eveline Snelders, Niels Frimodt-Møller, Humara Khan, a Klaus Leth Mortensen. 2010. Development of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* during Azole Therapy Associated with Change in Virulence. *PLoS ONE* 5(4):1-8.
- Armstrong, Donald. 1989. Problems in management of opportunistic fungal diseases. *Reviews of Infectious Diseases* 11:1591–99.
- Asano, Moe, Rui Kano, Koichi Makimura, Atsuhiko Hasegawa, a Hiroshi Kamata. 2011. Molecular typing and in-vitro activity of azoles against clinical isolates of *Aspergillus fumigatus* and *A. niger* in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 17(4):483–86.
- Badali, Hamid, Afsane Vaezi, Iman Haghani, Seyed A. Yazdanparast, Mohammad T. Hedayati, Bitia Mousavi, Saham Ansari, Ferry Hagen, Jacques F. Meis, a Anuradha Chowdhary. 2013. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses* 56(6):659–63.
- Bader, Oliver, Jana Tünnermann, Anna Dudakova, Marut Tangwattanachuleeporn, Michael Weig, Uwe Groß, Nora Hoberg, Stephan Geibel, Eva Vogel, Judith Büntzel, Jan Springer, Luca Yves Lehning, Chr Schädel, Elisabeth Antweiler, Luise Metzger, Andreas Zautner, Dieter Buchheidt, Birgit Spiess, Axel Hamprecht, Jörg Steinmann, Susann Rößler, Sara Wiegmann, Sara Klingebiel, Ann Chr Looock, Jana Hegewald, Maike Hassenpflug, Angela Aurin, Julian Szymczak, Nathalie Diffloth, a Martin Kuhns. 2015. Environmental isolates of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(7):4356–59.
- Bader, Oliver, Michael Weig, Utz Reichard, Raimond Lugert, Martin Kuhns, Martin Christner, Jürgen Held, Silke Peter, Ulrike Schumacher, Dieter Buchheidt, Kathrin Tintelnot, a Uwe Groß. 2013. Cyp51A-based mechanisms of *Aspergillus fumigatus* azole drug resistance present in clinical samples from Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(8):3513–17.
- Balkis, Maher M., Steven D. Leidich, Pranab K. Mukherjee, a Mahmoud A. Ghannoum. 2002. Mechanisms of Fungal Resistance. *Drugs* 62(7):1025–40.
- Becher, Rayko a Stefan G. R. Wirsal. 2012. Fungal cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) and azole resistance in plant and human pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology* 95(4):825–40.*
- Bedin Denardi, Laura, Bianca Hoch Dalla-Lana, Francielli Pantella Kunz de Jesus, Cecília Bittencourt Severo, Janio Morais Santurio, Régis Adriel Zanette, a Sydney Hartz Alves. 2018. *In vitro* antifungal susceptibility of clinical and environmental isolates of *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus* in Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 22(1):30–36.

- Belleste, Bahrie, Helene Raberin, Jerome Morel, Pierre Flori, Jamal Hafid, a Roger Tran Manh Sung. 2010. Acquired resistance to voriconazole and itraconazole in a patient with pulmonary aspergilloma. *Medical Mycology* 48(1):197–200.
- Bennett, Joan W. 2010. An Overview of the Genus *Aspergillus*. *Aspergillus Molecular Biology and Genomics*:1-17.*
- Berger, Sarah, Yassine El Chazli, Ambrin F. Babu, a Alix T. Coste. 2017. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: A consequence of antifungal use in agriculture? *Frontiers in Microbiology* 8(1024):1–6.
- Brown, Gordon D., David W. Denning, Neil A. R. Gow, Stuart M. Levitz, Mihai G. Netea, a Theodore C. White. 2012. Hidden Killers: Human Fungal Infections. 4(165):1–9.
- Buied, A., C. B. Moore, D. W. Denning, a P. Bowyer. 2013. High-level expression of cyp51B in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68(3):512–14.
- Camps, Smt M. T., B. E. Dutilh, M. C. Arendrup, Ajmm J. M. M. Rijs, a E. Snelders. 2012. Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. *PLoS ONE* 7(11):50034.
- Chen, J., L. Houmin, L. Ruoyu, B. Dingfang, a Zhe Wan. 2005. Mutations in the cyp51A gene and susceptibility to itraconazole in *Aspergillus fumigatus* serially isolated from a patient with lung aspergilloma. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55(1):31–37.
- Chen, Yong, Zhongyi Lu, Jingjun Zhao, Ziyang Zou, Yanwen Gong, Fen Qu, Zhiyao Bao, Guangbin Qiu, Mingsheng Song, Qing Zhang, Lin Liu, Mandong Hu, Xuelin Han, Shuguang Tian, Jingya Zhao, Fangyan Chen, Changjian Zhang, Yansong Sun, Paul E. Verweij, Liuyu Huang, a Li Han. 2016. Epidemiology and Molecular Characterizations of Azole Resistance in Clinical and Environmental *Aspergillus fumigatus* Isolates from China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(10):5878–84.
- Choukri, F., F. Botterel, E. Sitterlé, L. Bassinet, F. Foulet, J. Guillot, J. M. Costa, N. Fauchet, a Eric Dannaoui. 2015. Prospective evaluation of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* clinical isolates in France. *Medical Mycology* 53(6):593–96.
- Chowdhary, Anuradha, Shallu Kathuria, Harbans S. Randhawa, Shailendra N. Gaur, Corné H. Klaassen, a Jacques F. Meis. 2012. Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 67(2):362–66.
- Chowdhary, Anuradha, Shallu Kathuria, Jianping Xu, a Jacques F. Meis. 2013. Emergence of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains due to Agricultural Azole Use Creates an Increasing Threat to Human Health. *PLoS Pathogens* 9(10):1-5.*
- Chowdhary, Anuradha, Shallu Kathuria, Jianping Xu, Cheshta Sharma, Gandhi Sundar, Pradeep Kumar Singh, Shailendra N. Gaur, Ferry Hagen, Corné H. Klaassen, a Jacques F. Meis. 2012. Clonal Expansion and Emergence of Environmental Multiple-Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Strains Carrying the TR34/L98H Mutations in the cyp51A Gene in India. *PLoS ONE* 7(12):1–10.
- Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Mara van den Boom, Jan Bart Yntema, Ferry Hagen, Paul E. Verweij, a Jacques F. Meis. 2014. Multi-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment in Tanzania. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(11):2979–83.

- Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Ferry Hagen, a Jacques F. Meis. 2014. Exploring azole antifungal drug resistance in *Aspergillus fumigatus* with special reference to resistance mechanisms. *Future Microbiology* 9(5):697–711.
- Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Shallu Kathuria, Ferry Hagen, a Jacques F. Meis. 2014. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(2):555–57.
- Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, Shallu Kathuria, Ferry Hagen, a Jacques F. Meis. 2015. Prevalence and mechanism of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* in a referral chest hospital in Delhi, India and an update of the situation in Asia. *Frontiers in Microbiology* 6(428):1–10.
- Chowdhary, Anuradha, Cheshta Sharma, a Jacques F. Meis. 2017. Azole-resistant aspergillosis: Epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *Journal of Infectious Diseases* 216(3):436–44.
- Denning, David W., Jacques Cadranel, Catherine Beigelman-Aubry, Florence Ader, Arunaloke Chakrabarti, Stijn Blot, Andrew J. Ullmann, George Dimopoulos, a Christoph Lange. 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: Rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *European Respiratory Journal* 47(1):45–68.
- Denning, David W., Kostantinos Riniotis, Richard Dobrashian, a Helen Sambatakou. 2003. Chronic Cavitory and Fibrosing Pulmonary and Pleural Aspergillosis: Case Series, Proposed Nomenclature Change, and Review. *Clinical Infectious Diseases* 37(s3):265–80.
- Denning, David W., K. Venkateswarlu, Karen L. Oakley, M. J. Anderson, N. J. Manning, David A. Stevens, David W. Warnock, a Steven L. Kelly. 1997. Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 41(6):1364–68.
- Dudakova, Anna, Birgit Spiess, Marut Tangwattanachuleeporn, Christoph Sasse, Dieter Buchheidt, Michael Weig, Uwe Groß, a Oliver Bader. 2017. Molecular Tools for the Detection and Deduction of Azole Antifungal Drug Resistance Phenotypes in *Aspergillus* Species. *Clinical Microbiology Reviews* 30(4):1065–91.*
- Dunne, Katie, Ferry Hagen, Niamh Pomeroy, Jacques F. Meis, a Thomas R. Rogers. 2017. Intercountry Transfer of Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* on Plant Bulbs. *Clinical Infectious Diseases* 65(1):147–49.
- Escribano, Pilar, Teresa Peláez, Patricia Munoz, Emilio Bouza, a Jesús Guinea. 2013. Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 57(6):2815–20.
- Espinel-Ingroff, A., D. J. Diekema, A. Fothergill, E. Johnson, T. Pelaez, M. A. Pfaller, M. G. Rinaldi, E. Canton, a J. Turnidge. 2010. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *Journal of Clinical Microbiology* 48(9):3251–57.
- Fuhren, J., W. S. Voskuil, C. H. E. Boel, P. J. A. Haas, F. Hagen, J. F. Meis, a J. G. Kusters. 2015. High prevalence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from high-risk patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(10):2894–98.
- Garcia-Effron, Guillermo, Amanda Dilger, Laura Alcazar-Fuoli, Steven Park, Emilia Mellado, a David S. Perlin. 2008. Rapid Detection of Triazole Antifungal Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology* 46(4):1200–6.*

- Gonzalez-Lara, Maria F., Carla M. Roman-Montes, Paulette Diaz-Lomeli, Andrea Rangel-Cordero, Maria O. Valenzuela, Alfredo Ponce-de-Leon, Jose Sifuentes-Osornio, Luis Ostrosky-Zeichner, a Areli Martinez-Gamboa. 2019. Azole resistance and *cyp51A* mutation screening in *Aspergillus fumigatus* in Mexico. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* doi:10.1093/jac/dkz121
- Hagiwara, Daisuke, H. Takahashi, Akira Watanabe, A. Takahashi-Nakaguchi, Kawamoto. S., K. Kamei, a Gono T. 2014. Whole-genome comparison of *Aspergillus fumigatus* strains serially isolated from patients with aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 52(12):4202–9.
- Hamprecht, A., D. Buchheidt, J. J. Vehreschild, O. A. Cornely, B. Spiess, G. Plum, T. V. Halbsguth, N. Kutsch, D. Stippel, P. Kahl, T. Persigehl, A. Steinbach, B. Bos, M. Hallek, a M. J. Vehreschild. 2012. Azole-resistant invasive aspergillosis in a patient with acute myeloid leukaemia in Germany. *Eurosurveillance* 17(36):1.
- Hare, Rasmus K., Jan B. Gertsen, Karen M. T. Astvad, Kristine B. Degn, Anders Løkke, Marc Stegger, Paal S. Andersen, Lise Kristensen, a Maiken C. Arendrup. 2019. In Vivo Selection of a Unique Tandem Repeat Mediated Azole Resistance Mechanism (TR120) in *Aspergillus fumigatus* *cyp51A*, Denmark. *Emerging infectious diseases* 25(3):577–80.
- Hassan, T. M., U. G. Pedersen, E. G. Mathiasen, R. H. Jensen, K. M. T. Astvad, M. C. Arendrup, O. Hilberg, G. M. Thomsen, a M. Christensen. 2014. First Detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H Alterations in *Aspergillus fumigatus* Isolates from Azole-Naive Patients in Denmark despite Negative Findings in the Environment . *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 58(9):5096–5101.
- Heo, Sang Taek, Alexander M. Tatara, Cristina Jiménez-Ortigosa, Ying Jiang, Russell E. Lewis, Jeffrey Tarrand, Frank Tverdek, Nathaniel D. Albert, Paul E. Verweij, Jacques F. Meis, Antonios G. Mikos, David S. Perlin, a Dimitrios P. Kontoyiannis. 2017. Changes in *In vitro* Susceptibility Patterns of *Aspergillus* to Triazoles and Correlation with Aspergillosis Outcome in a Tertiary Care Cancer Center, 1999-2015. *Clinical Infectious Diseases* 65(2):216–25.
- Hodiamont, Caspar J., Koert M. Dolman, Ineke J. M. Ten berge, Willem J. G. Melchers, Paul E. Verweij, a Dasja Pajkrt. 2009. Multiple-azole-resistant *Aspergillus fumigatus* osteomyelitis in a patient with chronic granulomatous disease successfully treated with long-term oral posaconazole and surgery. *Medical Mycology* 47(2):217–20.
- Hokken, Margriet W. J., Jan Zoll, Jordy P. M. Coolen, Bas J. Zwaan, Paul E. Verweij, a Willem J. G. Melchers. 2019. Phenotypic plasticity and the evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*; An expression profile of clinical isolates upon exposure to itraconazole. *BMC Genomics* 20(1):1–17.
- Hortschansky, Peter, Martin Eisendle, Qusai Al-Abdallah, André D. Schmidt, Sebastian Bergmann, Marcel Thön, Olaf Knemeyer, Beate Abt, Birgit Seeber, Ernst R. Werner, Masashi Kato, Axel A. Brakhage, a Hubertus Haas. 2007. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex - A novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO Journal* 26(13):3157–68.
- Howard, Susan J., Dasa Cerar, Michael J. Anderson, Ahmed Albarrag, Matthew C. Fisher, Alessandro C. Pasqualotto, Michel Laverdiere, Maiken C. Arendrup, David S. Perlin, a David W. Denning. 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging Infectious Diseases* 15(7):1068–76.

- Howard, Susan J., Ian Webster, Caroline B. Moore, Rebecca E. Gardiner, Steven Park, David S. Perlin, a David W. Denning. 2006. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* 28(5):450–53.
- Hubka, V., A. Nováková, F. Sklenář, Z. Dudová, V. Barrs, T. Matsuzawa, J. J. Talbot, Y. Horie, M. Kolařík, A. Kubátová, J. C. Frisvad, a T. Yaguchi. 2018. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi* 41(1):142–74.*
- Hurst, Steven F., Elizabeth L. Berkow, Katherine L. Stevenson, Anastasia P. Litvintseva, a Shawn R. Lockhart. 2017. Isolation of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* from the environment in the south-eastern USA. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 72(9):2443–46.
- Jensen, R. H., F. Hagen, K. M. T. Astvad, A. Tyron, J. F. Meis, a M. C. Arendrup. 2016. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in Denmark: a laboratory-based study on resistance mechanisms and genotypes. *Clinical Microbiology and Infection* 22(6):1-23.
- Jensen, Rasmus Hare. 2016. Resistance in Human Pathogenic Yeasts and Filamentous Fungi: Prevalence, Underlying Molecular Mechanisms and Link to the Use of Antifungals in Humans and the Environment. *Danish Medical Journal* 57(614):1-34.*
- Jeurissen, A., S. Cooreman, W. Van Kerckhoven, J. Van Leemput, P. Vanhove, Katrien Lagrou, a L. Heytens. 2011. Invasive pulmonary aspergillosis due to a multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus*. *Acta Clinica Belgica* 67(1):46–48.
- Joseph-Horne, Tim a Derek W. Hollomon. 2006. Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *FEMS Microbiology Letters* 149(2):141–49.
- Judson, Marc A. a Thomas J. Walsh. 2000. Practice Guidelines for Diseases Caused by *Aspergillus* Article in Clinical Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases* 30:696–709.
- Kato, Masashi. 2005. An Overview of the CCAAT-Box Binding Factor in Filamentous Fungi: Assembly, Nuclear Translocation, and Transcriptional Enhancement. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69(4):663–72.
- Kemoi, Edson K., Andrew Nyerere, a Christine C. Bii. 2018. Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* from Fungicide-Experienced Soils in Naivasha Subcounty and Nairobi County, Kenya. *International Journal of Microbiology* 2018(7147983):1–6.
- Kidd, Sarah E., Emma Goeman, Jacques F. Meis, Monica A. Slavin, a Paul E. Verweij. 2015. Multi-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* infections in Australia. *Mycoses* 58(6):350–55.
- Koehler, Philipp, Axel Hamprecht, Oliver Bader, Isabelle Bekeredjian-Ding, Dieter Buchheidt, Gottfried Doelken, Johannes Elias, Gerhard Haase, Corinna Hahn-Ast, Meinolf Karthaus, Alexander Kekulé, Peter Keller, Michael Kiehl, Stefan W. Krause, Carolin Krämer, Silke Neumann, Holger Rohde, Paul La Rosée, Markus Ruhnke, Philippe Schafhausen, Enrico Schalk, Katrin Schulz, Stefan Schwartz, Gerda Silling, Peter Staib, Andrew Ullmann, Maria Vergoulidou, Thomas Weber, Oliver A. Cornely, a Maria J. G. T. Vehreschild. 2017. Epidemiology of invasive aspergillosis and azole resistance in patients with acute leukaemia: the SEPIA Study. *International Journal of Antimicrobial Agents* 49(2):218–23.

- Kosmidis, Chris a David W. Denning. 2015. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Postgraduate Medical Journal* 91(1077):403–10.
- Kuipers, Saskia, Roger J. M. Brüggemann, Ruud G. L. de Sévaux, John P. F. A. Heesakkers, Willem J. G. Melchers, Johan W. Mouton, a Paul E. Verweij. 2011. Failure of Posaconazole Therapy in a Renal Transplant Patient with Invasive Aspergillosis Due to *Aspergillus fumigatus* with Attenuated Susceptibility to Posaconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(7):3564–66.
- Kurtz, M. B., I. B. Heath, J. Marrinan, S. Dreikorn, J. Onishi, a C. Douglas. 1994. Morphological Effects of Lipopeptides against *Aspergillus fumigatus* Correlate with Activities against (1,3)-1-D-Glucan Synthase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 38(7):1480–89.
- Lamoth, Frédéric. 2016. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Frontiers in Microbiology* 7(683):1–8.*
- Lass-Flörl, Cornelia, Astrid Mayr, Maria Aigner, Michaela Lackner, a Dorothea Orth-Höller. 2018. A nationwide passive surveillance on fungal infections shows a low burden of azole resistance in molds and yeasts in Tyrol, Austria. *Infection* 46(5):701–4.
- Latgé, J. P. 1999. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis. *Clinical Microbiology Reviews* 12(2):310–50.
- Latgé, J. P. 2001. The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. *Trends in Microbiology* 9(8):382–89.
- Lavergne, Rose Anne, Taieb Chouaki, Ferry Hagen, Bénédicte Toubanc, Hervé Dupont, Vincent Jounieaux, Jacques F. Meis, Florent Morio, a Patrice Le Pape. 2017. Home environment as a source of life-threatening azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised patients. *Clinical Infectious Diseases* 64(1):76–78.
- Lavergne, Rose Anne, Florent Morio, Loïc Favennec, Stéphane Dominique, Jacques F. Meis, Gilles Gargala, Paul E. Verweij, a Patriqce Le Papea. 2015. First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(7):4331–35.
- Lee, Hyeon Jeong, Sung Yeon Cho, Dong Gun Lee, Chulmin Park, Hye Sun Chun, a Yeon Joon Park. 2018. TR34/L98H Mutation in CYP51A Gene in *Aspergillus fumigatus* Clinical Isolates During Posaconazole Prophylaxis: First Case in Korea. *Mycopathologia* 183(4):731–36.
- Lepesheva, Galina I. a Michael R. Waterman. 2007. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects* 1770(3):467–77.*
- Lestrade, P. P. A., J. F. Meis, W. J. G. Melchers, a P. E. Verweij. 2019. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clinical Microbiology and Infection*. doi:10.1016/j.cmi.2018.11.027
- Lestrade, Pieter P. A., Jacques F. Meis, Jan P. Arends, Martha T. van der Beek, Els de Brauwier, Karin van Dijk, Sabine C. de Greeff, Pieter Jan Haas, Caspar J. Hodiamont, Ed J. Kuijper, Tjalling Leenstra, Anouk E. Muller, Astrid M. L. Oude Lashof, Bart J. Rijnders, Eveline Roelofsen, Wouter Rozemeijer, Mathijs Tersmette, Elizabeth M. Terveer, Cees M. Verduin, Maurice J. H. M. Wolfhagen, Willem J. G. Melchers, a Paul E. Verweij. 2016. Diagnosis and management of aspergillosis in the Netherlands: A national survey. *Mycoses* 59(2):101–7.

- Lestrade, Pieter P., Robbert G. Bentvelsen, Alexander F. A. D. Schauwvlieghe, Steven Schalekamp, Walter J. F. M. van der Velden, Ed J. Kuiper, Judith van Paassen, Ben van der Hoven, Henrich A. van der Lee, Willem J. G. Melchers, Anton F. de Haan, Hans L. van der Hoeven, Bart J. A. Rijnders, Martha T. van der Beek, a Paul E. Verweij. 2018. Voriconazole Resistance and Mortality in Invasive Aspergillosis: A Multicenter Retrospective Cohort Study. *Clinical Infectious Diseases*. doi:10.1093/cid/ciy859
- Letscher-Bru, Valérie a Raoul Herbrecht. 2003. Caspofungin: The first representative of a new antifungal class. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51(3):513–21.
- Linden, J. W. M. va. der, M. C. Arendrup, A. Warris, K. Lagrou, H. Pelloux, P. M. Hauser, E. Chryssanthou, E. Mellado, S. E. Kidd, A. M. Tortorano, E. Dannaoui, P. Gaustad, J. W. Baddley, A. Uekötter, C. Lass-Flörl, N. Klimko, C. B. Moore, D. W. Denning, A. C. Pasqualotto, C. Kibbler, S. Arikan-Akdoglu, D. Andes, J. Meletiadis, L. Naumiuk, M. Nucci, W. J. G. Melchers, a P. E. Verweij. 2015. Prospective multicenter international surveillance of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Emerging Infectious Diseases* 21(6):1041–44.
- Linden, J. W. M. Va. Der, Simone M. T. Camps, Greetje A. Kampinga, Jan P. A. Arends, Yvette J. Debets-Ossenkopp, Pieter J. A. Haas, Bart J. A. Rijnders, Ed J. Kuijper, Frank H. Van Tiel, János Varga, Anna Karawajczyk, J. Zoll, Willem J. G. Melchers, a Paul E. Verweij. 2013. Aspergillosis due to voriconazole highly resistant *Aspergillus fumigatus* and recovery of genetically related resistant isolates from domiciles. *Clinical Infectious Diseases* 57(4):513–20.
- Linden, J. W. M. van der, Eveline Snelders, Greetje A. Kampinga, Bart J. A. Rijnders, Eva Mattsson, Yvette J. Debets-Ossenkopp, Ed J. Kuijper, Frank H. van Tiel, Willem J. G. Melchers, a Paul E. Verweij. 2011. Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerging Infectious Diseases* 17(10):1846–54.
- Lockhart, Shawn R., João P. Frade, Kizee A. Etienne, Michael A. Pfaller, Daniel J. Diekema, a S. Arunmozhi Balajee. 2011. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the cyp51A gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 55(9):4465–68.
- Maertens, J. A. 2004. History of the development of azole derivatives. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 10:1–10.
- Meis, Jacques F., Anuradha Chowdhary, Johanna L. Rhodes, Matthew C. Fisher, a Paul E. Verweij. 2016. Clinical implications of globally emerging azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 371(1709):1-10.
- Mellado, E., T. M. Diaz-Guerra, M. Cuenca-Estrella, a J. L. Rodriguez-Tudela. 2001. Identification of Two Different 14-Sterol Demethylase-Related Genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and Other *Aspergillus* species. *Journal of Clinical Microbiology* 39(7):2431–38.
- Mellado, E., G. Garcia-Effron, L. Alcázar-Fuoli, W. J. G. Melchers, P. E. Verweij, M. Cuenca-Estrella, a J. L. Rodriguez-Tudela. 2007. A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring *in vitro* cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51(6):1897–1904.

- Montesinos, Isabel, Magali Dodemont, Katrien Lagrou, Frederique Jacobs, Isabelle Etienne, a Olivier Denis. 2014. New case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 69(12):3439–40.
- Mortensen, Klaus Leth, Emilia Mellado, Cornelia Lass-Flörl, Juan Luis Rodriguez-Tudela, Helle Krogh Johansen, a Maiken Cavling Arendrup. 2010. Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* and other aspergilli in Austria, Denmark, and Spain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(11):4545–49.
- Mousavi, Bit a Hamid Badali. 2015. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the cyp51A gene in Iran. *Journal de Mycologie Médicale* 25(2):e98.
- Mushi, Martha F., Gustave Buname, Oliver Bader, Uwe Groß, a Stephen E. Mshana. 2016. *Aspergillus fumigatus* carrying TR34/L98H resistance allele causing complicated suppurative otitis media in Tanzania: Call for improved diagnosis of fungi in sub-Saharan Africa. *BMC Infectious Diseases* 16(464):1–6.
- Nawrot, Urszula, Ewelina Kurzyk, Maiken Cavling Arendrup, Martyna Mroczynska, Katarzyna Włodarczyk, Beata Sulik-Tyszka, Marta Wróblewska, Marek Ussowicz, Przemysław Zdziarski, Kinga Niewinska, a Anna Brillowska-Dabrowska. 2017. Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. *Medical Mycology* 56(1):121–24.
- Nawrot, Urszula, Ewelina Kurzyk, Maiken Cavling Arendrup, Martyna Mroczynska, Katarzyna Włodarczyk, Beata Sulik-Tyszka, Marta Wróblewska, Marek Ussowicz, Przemysław Zdziarski, Kinga Niewinska, a Anna Brillowska-Dabrowska. 2018. Detection of Polish clinical *Aspergillus fumigatus* isolates resistant to triazoles. *Medical Mycology* 56(1):121–24.
- Nedel, Wagner L. a Alessandro C. Pasqualotto. 2014. Treatment of Infections by Cryptic *Aspergillus* Species. *Mycopathologia* 178(5–6):441–45.
- Onishi, Kenji, Bolu Muhammad Sarumoh, Daisuke Hagiwara, Akira Watanabe, Katsuhiko Kamei, a Takahito Toyotome. 2017. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in cyp51A Promoter is Isolated from the Environment in Japan. *Medical Mycology Journal* 58(2):67–70.
- Özmerdiven, Gülşah Ece, Seçil Ak, Beyza Ener, Harun Ağca, Burcu Dalyan Cilo, Berrin Tunca, a Halis Akalin. 2015. First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *Journal of Infection and Chemotherapy* 21(8):581–86.
- Paassen, J. Va., A. Russcher, A. W. In't Veld-Van Wingerden, P. E. Verweij, a E. J. Kuijper. 2016. Emerging aspergillosis by azole-resistant *Aspergillus fumigatus* at an intensive care unit in the Netherlands, 2010 to 2013. *Eurosurveillance* 21(30):30300.
- Paul, Sanjoy, Daniel Diekema, a W. Scott Moye-Rowley. 2017. Contributions of both ATP-Binding Cassette Transporter and Cyp51A Proteins Are Essential for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 61(5).
- Pelaez, Teresa, Paloma Gijón, Eleonora Bunsow, Emilio Bouza, Waldo Sánchez-Yebra, Maricela Valerio, Beatriz Gama, Manuel Cuenca-Estrella, a Emilia Melladod. 2012. Resistance to voriconazole due to a G448S substitution in *Aspergillus fumigatus* in a patient with cerebral aspergillosis. *Journal of Clinical Microbiology* 50(7):2531–34.

- Perlin, David S., Riina Rautemaa-Richardson, a Ana Alastruey-Izquierdo. 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *The Lancet Infectious Diseases* 17(12):383–92.
- Peyton, L. R., S. Gallagher, a M. Hashemzadeh. 2015. Triazole antifungals: A review. *Drugs of Today* 51(12):705–18.
- Pinto, Eugénia, Carolina Monteiro, Marta Maia, Miguel A. Faria, Virgínia Lopes, Catarina Lameiras, a Dolores Pinheiro. 2018. *Aspergillus* species and antifungals susceptibility in clinical setting in the north of Portugal: Cryptic species and emerging azoles resistance in *A. fumigatus*. *Frontiers in Microbiology* 9(1656):1–9.
- Price, Claire L., Josie E. Parker, Andrew GS Warrilow, Diane E. Kelly, a Steven L. Kelly. 2015. Azole fungicides - understanding resistance mechanisms in agricultural fungal pathogens. *Pest Management Science* 71(8):1054–58.*
- Prigitano, Anna, Maria Carmela Esposto, Arianna Biffi, Gabriella De Lorenzis, Vincenza Favuzzi, Raffaella Koncan, Giuliana Lo Cascio, Marisol Barao Ocampo, Carla Colombo, Giovanna Pizzamiglio, Luisa Romanò, a Anna Maria Tortorano. 2017. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. *Journal of Cystic Fibrosis* 16(1):64–69.
- Quereda, Juan J. a Pascale Cossart. 2017. Molecular Evolution of Antifungal Drug Resistance. *Annual Review of Microbiology* 71:263–80.*
- Rath, P. M., D. Buchheidt, B. Spiess, E. Arfanis, J. Buer, a J. Steinmann. 2012. First Reported Case of Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus* Due to the TR/L98H Mutation in Germany. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(11):6060–61.
- Ren, Jingbei, Xiangxiang Jin, Qian Zhang, Yuan Zheng, Dunli Lin, a Yunlong Yu. 2017. Fungicides induced triazole-resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with mutations of TR46/Y121F/T289A and its appearance in agricultural fields. *Journal of Hazardous Materials* 326:54–60.
- Repentigny, L. d., S. W. Chapman, V. A. Morrison, J. W. Hiemenz, G. M. Cox, P. Pappas, C. A. Kauffman, J. Y. Lee, J. R. Perfect, a D. A. Stevens. 2002. The Impact of Culture Isolation of *Aspergillus* Species: A Hospital-Based Survey of Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 33(11):1824–33.
- Riat, Arnaud, Jérôme Plojoux, Katia Gindro, Jacques Schrenzel, a Dominique Sanglard. 2018. Azole resistance of environmental and clinical *Aspergillus fumigatus* isolates from Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62(4):1-7.
- Rodriguez-Tudela, Juan Luis, Laura Alcazar-Fuoli, Emilia Mellado, Ana Alastruey-Izquierdo, Araceli Monzon, a Manuel Cuenca-Estrella. 2008. Epidemiological cutoffs and cross-resistance to azole drugs in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52(7):2468–72.
- Segal, Brahm H. M. D. 2009. Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine* 360(1):1870–84.
- Sewell, Thomas, Yuyi Zhang, Jennifer M. G. Shelton, Johanna Rhodes, Fisher M. R. C. Centre, Global Infectious, Disease Analysis, a Infectious Disease Epidemiology. 2019. Elevated prevalence of azole resistant *Aspergillus fumigatus* in urban versus rural environments in the United Kingdom. *bioRxiv* dx.doi.org/10.1101/598961.

- Seyedmousavi, Seyedmojtaba, Seyed Jamal Hashemi, Ensieh Zibafar, Jan Zoll, Johan W. Hedayati, Mohammad T. Mouton, Willem J. G. Melchers, a Paul E. Verweij. 2013. Azole-Resistant *Aspergillus fumigatus*, Iran. *Emerging Infectious Diseases* 19(5):832–34.
- Sharma, Cheshta, Ferry Hagen, Ruxandra Moroti, Jacques F. Meis, a Anuradha Chowdhary. 2015. Triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* harbouring G54 mutation: Is it de novo or environmentally acquired? *Journal of Global Antimicrobial Resistance* 3(2):69–74.
- da Silva Ferreira, Márcia Eliana, Iran Malavazi, Marcela Savoldi, Axel A. Brakhage, Maria Helena S. Goldman, H. Stanley Kim, William C. Nierman, a Gustavo H. Goldman. 2006. Transcriptome analysis of *Aspergillus fumigatus* exposed to voriconazole. *Current Genetics* 50(1):32–44.
- Snelders, Eveline. 2012. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: collateral damage of fungicide use. ISBN: 978-90-9026634-3*
- Snelders, Eveline, Robert A. G. Huis In't Veld, Anthonius J. M. M. Rijs, Gert H. J. Kema, Willem J. G. Melchers, a Paul E. Verweij. 2009. Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Applied and Environmental Microbiology* 75(12):4053–57.
- Steinmann, J., A. Hamprecht, M. J. G. T. Vehreschild, O. A. Cornely, D. Buchheidt, B. Spiess, M. Koldehoff, J. Buer, J. F. Meis, a P. M. Rath. 2014. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(5):1522–26.
- Steinmann, J., A. Hamprecht, M. J. G. T. Vehreschild, O. A. Cornely, D. Buchheidt, B. Spiess, M. Koldehoff, J. Buer, J. F. Meis, a P. M. Rath. 2015. Emergence of azole-resistant invasive aspergillosis in HSCT recipients in Germany. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 70(5):1522–26.
- Sugui, Janyce A., Kyung J. Kwon-Chung, Praveen R. Juvvadi, Jean Paul Latgé, a William J. Steinbach. 2015. *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5(2):1-17.
- Tangwattanachuleeporn, Marut, Nanthakan Minarin, Saranya Saichan, Pornsuda Sermsri, Ruthairat Mitkornburee, Uwe Groß, Ariya Chindamporn, a Oliver Bader. 2017. Prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in the environment of Thailand. *Medical mycology* 55(4):429–35.
- Tanoue, Shinjiro, Ken-ichi Kamei, Hideya Goda, Akimitsu Tanaka, Tetsuo Kobayashi, Norihiro Tsukagoshi, a Masashi Kato. 2006. The Region in a Subunit of the *Aspergillus* CCAAT-Binding Protein Similar to the HAP4p-Recruiting Domain of *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p Is Not Essential for Transcriptional Enhancement. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 70(4):782–87.
- Tashiro, Masato, Koichi Izumikawa, Katsuji Hirano, Shotaro Ide, Tomo Mihara, Naoki Hosogaya, Takahiro Takazono, Yoshitomo Morinaga, Shigeki Nakamura, Shintaro Kurihara, Yoshifumi Imamura, Taiga Miyazaki, Tomoya Nishino, Misuzu Tsukamoto, Hiroshi Takeya, Yoshihiro Yamamoto, Katsunori Yanagihara, Akira Yasuoka, Takayoshi Tashiro, a Shigeru Kohno. 2012. Correlation between Triazole Treatment History and Susceptibility in Clinically Isolated *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(9):4870–75.

- Tashiro, Masato, Koichi Izumikawa, Asuka Minematsu, Katsuji Hirano, Naoki Iwanaga, Shotaro Ide, Tomo Mihara, Naoki Hosogaya, Takahiro Takazono, Yoshitomo Morinaga, Shigeki Nakamura, Shintaro Kurihara, Yoshifumi Imamura, Taiga Miyazaki, Tomoya Nishino, Misuzu Tsukamoto, Hiroshi Kakeya, Yoshihiro Yamamoto, Katsunori Yanagihara, Akira Yasuoka, Takayoshi Tashiro, a Shigeru Kohno. 2012. Antifungal susceptibilities of *Aspergillus fumigatus* clinical isolates obtained in Nagasaki, Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(1):584–87.
- Tobin, Matthew B., Robert B. Peery, a Paul L. Skatrud. 1997. Genes encoding multiple drug resistance-like proteins in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus flavus*. *Gene* 200(1–2):11–23.
- Toyotome, Takahito, Daisuke Hagiwara, Hideyuki Kida, Takahiro Ogi, Akira Watanabe, Terumi Wada, Ryoichi Komatsu, a Katsuhiko Kamei. 2016. First clinical isolation report of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H-type mutation in Japan. *Journal of Infection and Chemotherapy* 23(8):579–81.
- Tsitsopoulou, Alexandra, Raquel Posso, Lorna Vale, Scarlett Bebb, Elizabeth Johnson, a P. L. White. 2018. Determination of the prevalence of triazole resistance in environmental *Aspergillus fumigatus* strains isolated in South Wales, UK. *Frontiers in Microbiology* 9:1–8.
- Tullion, Di, E, L. Camanzi, F. Fontolan, C. Volpato, a S. Zucconi. 2012. The assessment of the economic importance of azoles in European agriculture: wheat case study :1-15.
- Vazquez, Jose A. a Elias K. Manavathu. 2016. Molecular characterization of a voriconazole-resistant, posaconazole-susceptible *Aspergillus fumigatus* isolate in a lung transplant recipient in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60(2):1129–33.
- Vermeulen, E., J. Maertens, H. Schoemans, a K. Lagrou. 2012. Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Eurosurveillance* 17(48):1–3.
- Vermeulen, Edith, Johan Maertens, Annelies De Bel, Eric Nulens, Jerina Boelens, Ignace Surmont, Anna Mertens, An Boel, a Katrien Lagrou. 2015. Nationwide Surveillance of Azole Resistance in *Aspergillus* Diseases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 59(8):4569–76.
- Verweij, P. E., Michelle Ananda-Rajah, David Andes, Maiken C. Arendrup, Roger J. Brüggemann, Anuradha Chowdhary, Oliver A. Cornely, David W. Denning, Andreas H. Groll, Koichi Izumikawa, Bart Jan Kullberg, Katrien Lagrou, Johan Maertens, Jacques F. Meis, Pippa Newton, Iain Page, Seyedmojtaba Seyedmousavi, Donald C. Sheppard, Claudio Viscoli, Adilia Warris, a J. Peter Donnelly. 2015. International expert opinion on the management of infection caused by azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Drug Resistance Updates* 2015(21–22):30–40.
- Verweij, P. E., E. Mellado, a W. J. Melchers. 2007. Multiple-Triazole-Resistant Aspergillosis. *The New England Journal of Medicine* 356(14):1481–83.
- Verweij, Paul E., Susan J. Howard, Willem J. G. Melchers, a David W. Denning. 2009. Azole-resistance in *Aspergillus*: Proposed nomenclature and breakpoints. *Drug Resistance Updates* 12(6):141–47.

- Verweij, Paul E., Robert A. Samson, Judith Kuijpers, János Varga, Eveline Snelders, Anthonius J. M. M. Rijs, Willem J. G. Melchers, Henrich A. L. van der Lee, A. Rogier T. Donders, a Emilia Mellado. 2008. Emergence of Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* and Spread of a Single Resistance Mechanism. *PLoS Medicine* 5(11):219.
- Verweij, Paul E., Jianhua Zhang, Alfons J. M. Debets, Jacques F. Meis, Frank L. van de Veerdonk, Sijmen E. Schoustra, Bas J. Zwaan, a Willem J. G. Melchers. 2016. In-host adaptation and acquired triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a dilemma for clinical management. *The Lancet Infectious Diseases* 16(11):251–60.
- Walsh, Thomas J., Elias J. Anaissie, David W. Denning, Raoul Herbrecht, Dimitrios P. Kontoyiannis, Kieren A. Marr, Vicki A. Morrison, Brahm H. Segal, William J. Steinbach, David A. Stevens, Jo-Anne van Burik, John R. Wingard, a Thomas F. Patterson. 2008. Treatment of Aspergillosis: Clinical Practice Guidelines of the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 46:327–60.
- Wang, Hsuan Chen, Jui Chang Huang, Yong Hong Lin, Yu Hsin Chen, Ming I. Hsieh, Pui Ching Choi, Hsiu Jung Lo, Wei Lun Liu, Ching Shan Hsu, Hsin I. Shih, Chi Jung Wu, a Yee Chun Chen. 2018. Prevalence, mechanisms and genetic relatedness of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* exhibiting resistance to medical azoles in the environment of Taiwan. *Environmental Microbiology* 20(1):270–80.
- Warrilow, Andrew G. S., Nadja Melo, Claire M. Martel, Josie E. Parker, W. David Nes, Steven L. Kelly, a Diane E. Kelly. 2010. Expression, purification, and characterization of *Aspergillus fumigatus* sterol 14- α demethylase (CYP51) isoenzymes A and B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 54(10):4225–34.*
- Waterman, Michael R. a Galina I. Lepesheva. 2005. Sterol 14 α -demethylase, an abundant and essential mixed-function oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 338(1):418–22.*
- Wiederhold, Nathan P., Veronica Garcia Gil, Felipe Gutierrez, Jonathan R. Lindner, Mohammad T. Albataineh, Dora I. McCarthy, Carmita Sanders, Hongxin Fan, Annette W. Fothergill, a Deanna A. Sutton. 2016. First detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 mutations in *Aspergillus fumigatus* isolates in the United States. *Journal of Clinical Microbiology* 54(1):168–71.
- Wilcock, B. C., K. C. Gray, I. Dailey, M. M. Endo, D. S. Palacios, B. E. Uno, a M. D. Burke. 2012. Amphotericin primarily kills yeast by simply binding ergosterol. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(7):2234–39.
- Xiong, Quanbo, Saad A. Hassan, William K. Wilson, Xiang Y. Han, Gregory S. May, Jeffrey J. Tarrand, a Seiichi P. T. Matsuda. 2005. Cholesterol Import by *Aspergillus fumigatus* and Its Influence on Antifungal Potency of Sterol Biosynthesis Inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(2):518–24.

* sekundární citace